

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12P 19/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/53087</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 21. Oktober 1999 (21.10.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/02320 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 6. April 1999 (06.04.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 15 864.5      8. April 1998 (08.04.98)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> EUROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULARBIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> FAULSTICH, Konrad [DE/DE]; EMBL, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; EMBL, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> 5'-MODIFIED NUCLEOTIDES AND THE APPLICATION THEREOF IN MOLECULAR BIOLOGY AND MEDICINE <b>(54) Bezeichnung:</b> 5'-MODIFIZIERTE NUKLEOTIDE UND IHRE ANWENDUNG IN DER MOLEKULARBIOLOGIE UND MEDIZIN <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to 5'-modified nucleotides and nucleic acids containing said nucleotides. The invention also relates to methods for integrating 5'-modified nucleotides in nucleic acids and subsequent localized splitting of the nucleic acids on the 5'-modified monomer structural elements. The inventive methods can be used in nucleic acid sequencing, in the creation of nucleic acid libraries, in the detection of mutations, in the production of carrier-bound nucleic acids and for pharmaceutical purposes.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft 5'-modifizierte Nukleotide und diese Nukleotide enthaltende Nukleinsäuren. Weiterhin werden Verfahren zum Einbau der 5'-modifizierten Nukleotide in Nukleinsäuren und die anschließende ortspezifische Spaltung der Nukleinsäuren an den 5'-modifizierten Monomerbausteinen offenbart. Diese Verfahren können zur Nukleinsäuresequenzierung, zur Erzeugung von Nukleinsäurebibliotheken, zum Nachweis von Mutationen, zur Herstellung trägergebundener Nukleinsäuren und für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **5'-modifizierte Nukleotide und ihre Anwendung in der Molekularbiologie und Medizin**

5

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft 5'-modifizierte Nukleotide und diese Nukleotide enthaltende Nukleinsäuren. Weiterhin werden Verfahren zum Einbau der 5'-modifizierten Nukleotide in Nukleinsäuren und die anschließende ortspezifische Spaltung der Nukleinsäuren an den 5'-modifizierten Monomerbausteinen offenbart. Diese Verfahren können zur Nukleinsäuresequenzierung, zur Erzeugung von Nukleinsäurebibliotheken, zum Nachweis von Mutationen, zur Herstellung trägergebundener Nukleinsäuren und für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden.

15

Die heute routinemäßig angewandten Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren beinhalten im allgemeinen die Polymerisation eines zu einer Matrize komplementären Nukleinsäurestrangs und die Erzeugung eines Gemisches an Nukleinsäurefragmenten mit allen möglichen Längen (1). Dieses Nukleinsäurefragmentgemisch kann durch Termination der Polymerisation oder Abbau durch Exonukleasen (2), iterative Sequenziermethoden (3), Zugabe einzelner Basen und Nachweis der Freisetzung von Pyrophosphat (4), chemische Methoden unter Verwendung von Eliminationsreaktionen (5), chemisch-enzymatische Methoden unter Einbau von modifizierten Nukleosiden und Spaltung durch Angriff auf Phosphorthioat- oder Bor-modifizierte Nukleotide (6), Einbau von Ribonukleosiden in DNA und anschließende Spaltung unter basischen Bedingungen (7) oder den Einbau von 3'-farbmarkierten Nukleotiden mit gleichzeitiger oder nachfolgender Abspaltung des Farbstoffs (8) erfolgen. Neben diesen Methoden stehen auch Strategien zur Verfügung, die eine Sequenzierung durch Hybridisierung (9) und eine physikalische Fragmenterzeugung durch Massenspektrometri

30

(10) beinhalten. Auch ein Nachweis durch Atomkraftmikroskopie (11) wurde diskutiert.

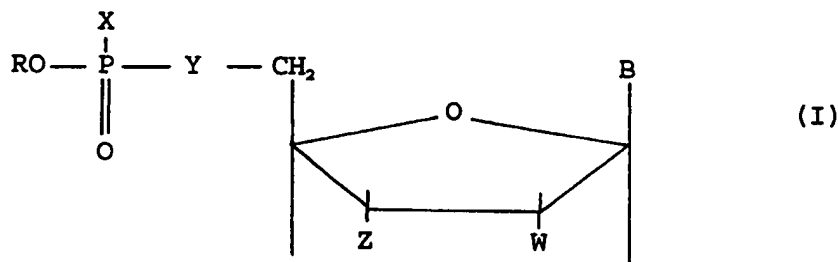
In den letzten zwanzig Jahren ist die Methode der Wahl jedoch die enzymatische Kettenabbruchmethode gewesen. Diese Methode ermöglicht eine Automatisierung und eine Sequenzierung mit hohem Durchsatz zur Anwendung bei der Sequenzierung ganzer Genome. Die Automatisierung wurde durch Verwendung von Farbstoffprimern (12), interne Markierung (13) oder Farbstoffterminatoren (14) erreicht. Die Sequenzierung mit Farbstoffprimern und die interne Markierung haben jedoch den Nachteil, daß irreguläre Terminationsvorgänge in der Sequenzleiter auftreten und zur Fehlinterpretation der Sequenzdaten führen können. Farbstoffterminatoren haben den Nachteil, daß sie zum Teil an falschen Stellen eingebaut werden und nur eine begrenzte Ableselänge ermöglichen, da es sich bei ihnen um modifizierte Substrate handelt.

Darüber hinaus besteht ein Bedürfnis, die für eine Sequenzbestimmung benötigte DNA-Menge zu verringern. Hierzu steht derzeit nur eine einzige Zyklussequenzierungsmethode zur Verfügung (15), die jedoch im Gegensatz zu PCR, wo eine exponentielle Amplifikation stattfindet, nur zu einer linearen Amplifikation der Produkte führt. Die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten weist wiederum Nachteile auf, da in den Reaktionsgefäßen größere Mengen an Triphosphaten und Primermolekülen vorliegen, die zu einer Beeinträchtigung der Sequenzierungsreaktion oder der Sequenzbestimmung führen können (16). Die Aufreinigung von PCR-Produkten ist jedoch zeitaufwendig und bedeutet einen zusätzlichen Verfahrensschritt. Zwar können Triphosphate durch enzymatische Methoden (17) gespalten werden, aber auch dies ist zeitaufwendig und erhöht die Kosten für die Durchführung der Sequenzierungsreaktion. Als Alternative steht ein direktes exponentielles Amplifikations- und Sequenzierverfahren (DEXAS) zur Sequenzierung geringer Mengen an DNA-Material zur Verfügung (18); dieses Verfahren konnte bisher jedoch nicht für eine Standardsequenzierung

eingesetzt werden und ist - im Gegensatz zu seinem Namen - nicht direkt exponentiell.

Gemäß vorliegender Erfindung wird ein neues Nukleinsäuresequenzierungsverfahren bereitgestellt, bei dem die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise vermieden werden. Durch dieses Verfahren wird insbesondere das Problem der Substratspezifität hinsichtlich Farbstoffterminatoren vermieden und es ermöglicht eine schnelle DNA-Sequenzierung unter Verwendung sehr geringer Mengen an DNA-Ausgangsmaterial in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikationsreaktion wie etwa PCR. Auch die lesbare Länge der sequenzierbaren Matrizen wird durch das Verfahren verbessert.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I):



worin:

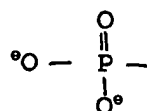
B eine Nukleobase, d.h. eine natürliche oder nichtnatürliche zur Hybridisierung mit komplementären Nukleinsäuresträngen geeignete Base wie etwa A, C, G, T, U, I, 7-Deaza-G, 7-Deaza-A, 5-Methyl-C etc. bedeutet,

W und Z jeweils  $\text{OR}^1$ ,  $\text{SR}^1$ ,  $\text{N(R}^1)_2$  oder  $\text{R}^1$  bedeuten, wobei  $\text{R}^1$  jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen Wasserstoff oder einen organischen Rest, z.B. einen Alkyl-, Alkenyl-, Hydroxyalkyl-, Amin-, Ester-, Acetal- oder Thioesterrest, vorzugsweise mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen und besonders bevorzugt mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen darstellt,

- X  $OR^2$ ,  $SR^2$  oder  $B(R^2)_3$  bedeutet, wobei  $R^2$  jeweils unabhängig Wasserstoff, ein Kation, z.B. ein Alkalimetall- oder Ammoniumion, oder einen organischen Rest, z.B. einen Farbstoff wie etwa Fluoresceine, Rhodamine, Cyanine und deren Derivate bedeutet,
- 5 Y  $NR^3$  oder S, insbesondere  $NR^3$  bedeutet, wobei  $R^3$  Wasserstoff oder einen organischen Rest, z.B. einen gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffrest, insbesondere einen  $C_1$ - $C_4$ -Rest oder einen Farbstoffrest darstellt, wobei unter Wasserstoff auch die Isotopen Deuterium und Tritium zu verstehen sind, und
- 10 R Wasserstoff, ein Kation, einen organischen Rest oder eine gegebenenfalls modifizierte Phosphat- oder Diphosphatgruppe, insbesondere eine Diphosphatgruppe bedeutet,
- zum Einbau in Nukleinsäuren und zur anschließenden ortsspezifischen Spaltung der Nukleinsäuren, vorzugsweise durch Hydrolyse der Bindung P-Y, wobei Nukleinsäurefragmente mit einem 5'-Ende  $HY-CH_2-$  entstehen.
- 15

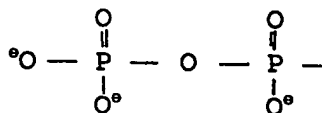
Die Gruppe R kann einen organischen Rest bedeuten, beispielsweise einen lipophilen Rest, der das Eindringen der Substanz in eine Zelle erleichtert. Vorzugsweise ist R eine Phosphatgruppe:

20



oder eine Diphosphatgruppe:

25



Diese Phosphat- oder Diphosphatgruppe kann modifiziert sein. So können ein oder mehrere endständige Sauerstoffatome Substituenten tragen, z.B. organische Reste. Andererseits können ein oder mehrere endständige Sauerstoffatome und - bei der Diphosphatgruppe - auch das Brückensauerstoffatom durch Gruppen wie S,  $NR^3$  oder  $C(R^3)_2$  ausgetauscht sein, wobei

30

$R^3$  wie zuvor definiert ist. Darüber hinaus können auch 2 Substituenten an endständigen Sauerstoffatomen miteinander verbrückt sein.

Wenn Substituenten vorhanden sind, befinden sie sich vorzugsweise an Sauerstoffatomen des jeweils endständigen Phosphoratoms, besonders bevorzugt am  $\gamma$ -Phosphoratom. Beispiele für geeignete Substituenten sind organische Reste wie etwa Alkylreste, die selbst substituiert sein können, oder eine Salicylgruppe, die mit 2 Sauerstoffatomen des endständigen Phosphors einen 6-gliedrigen cyclischen Diester bilden kann. Der aromatische Kern der Salicylgruppen kann wiederum selbst einen oder mehrere zusätzliche Substituenten tragen, z.B. solche wie für  $R^1$  definiert oder Halogenatome. Weiterhin bevorzugte Substituenten am Sauerstoffatom sind Reste wie  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl,  $-(CH_2)_n-N_3$ ,  $(CH_2)_nN(R^3)_2$  oder  $-(CH_2)_nNHOCO(CH_2)_m-N(R^3)_2$ , wobei  $n$  und  $m$  ganze Zahlen von 1 bis 8, vorzugsweise von 2 bis 5 sind und  $R^3$  wie zuvor definiert ist, aber außerdem vorzugsweise einen aromatischen Rest wie etwa Phenyl- oder Dinitrophenyl bedeuten kann.

Der Einbau von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) in Nukleinsäuren erfolgt vorzugsweise enzymatisch. Möglich ist jedoch auch eine chemische Synthese. Für einen enzymatischen Einbau werden vorzugsweise Enzyme verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, DNA-abhängigen RNA Polymerasen, RNA-abhängigen DNA Polymerasen, RNA-abhängigen RNA Polymerasen und Terminalen Transferasen. Besonders bevorzugt ist die T7 DNA-Polymerase, verwandte Enzyme wie etwa die T3 oder die SP6 DNA Polymerase oder Modifikationen dieser Enzyme. Dementsprechend kann es sich bei den Nukleinsäuren, in die die Verbindungen der Formel (I) eingebaut werden, um DNAs oder/und RNAs handeln, die gegebenenfalls ein oder mehrere weitere modifizierte Nukleotidbausteine tragen können.

Nukleinsäuren, die als Monomerbausteine mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthalten, können an dem die P-Y Bindung enthalten-

- d n Nukleotidbaust in ortsspezifisch gespalten werden. Diese ortsspezifische Spaltung kann beispielsweise an der P-Y-Bindung selbst durch Temperaturerhöhung, z.B. auf mindestens 37°C, Einstellung saurer Bedingungen, z.B.  $\text{pH} \leq 5$ , Mikrowellenbehandlung, Laserbehandlung, z.B. mit einem Infrarotlaser oder/und 3'-seitig des die P-Y-Bindung enthaltenden Nukleotids durch enzymatischen Verdau, beispielsweise mit Exo- oder Endonukleasen oder Phosphodiesterasen, z.B. 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase erfolgen.
- Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch in Kombination mit einer Amplifikationsreaktion, z.B. einer PCR, durchgeführt werden. Dies erlaubt die Verwendung von extrem geringen Mengen an DNA-Ausgangsmaterial zur Erzeugung markierter komplementärer Nukleinsäurestränge. Vorzugsweise wird die Nukleinsäureamplifikation mit thermostabilen Enzymen in mehreren Zyklen durchgeführt.

Der Einbau der Verbindungen gemäß (I) in die Nukleinsäuren kann in Lösung erfolgen. Alternativ kann der Einbau der Verbindungen jedoch auch in trägergebundene Nukleinsäuren erfolgen. Nach der Synthese kann dann eine Freisetzung der Nukleinsäuren vom Träger, gegebenenfalls durch die ortsspezifische Spaltung der P-Y-Bindung oder durch andere Methoden erfolgen.

Nach der ortsspezifischen Spaltung der Nukleinsäuren werden Nukleinsäurefragmente erzeugt, die vorzugsweise an ihrem 5'-Ende die Gruppe  $\text{Y-CH}_2$ - oder/und an ihrem 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweisen. Bisher mußten derart modifizierte Nukleinsäuren auf komplizierte Art und Weise durch chemische Synthese (19) oder durch enzymatische Reaktionen (20, 21) erzeugt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist wesentlich schneller, kostengünstiger und erlaubt eine einfachere Handhabung der Verbindungen. Die auf diese Weise hergestellten modifizierten Nukleinsäuren können für therapeutische Zwecke oder/und für molekularbiologische Untersuchungen,



z.B. Untersuchungen von Mechanismen der Aufnahme und des Metabolismus von Nukleinsäuren in Zellen verwendet werden, da an die 5'-Y-Gruppe auf einfache Weise eine Markierungsgruppe gekoppelt werden kann. Die 3'-Phosphatgruppe wiederum stellt eine Schutzgruppe gegenüber einer Ligation oder/und einer enzymatischen Elongation mit Polymerasen dar. An das phosphorylierte 3'-Ende der Nukleinsäurefragmente können - sofern gewünscht - Markierungsgruppen angefügt werden, z.B. wenn eine Dephosphorylierung durchgeführt wird und an die resultierende 3'-OH-Gruppe durch eine enzymatische Reaktion beispielsweise unter Verwendung von Ligase oder Terminaler Transferase markierte Oligonukleotide oder mit einer Polymerase markierte Dideoxynukleosidtriphosphate angefügt werden oder wenn die 3'-Phosphatgruppe eine reaktive Gruppe z.B. ein Schwefelatom enthält.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente aufgrund der definierten Gruppe an ihrem 5'-Ende auf einfache Weise auf einem Träger immobilisiert werden, der eine mit der Gruppe Y reaktive, funktionalisierte Oberfläche enthält. Andererseits kann auch eine adsorptive Bindung über die Gruppe Y an eine Oberfläche erfolgen. Geeignete Träger sind solche, die Oberflächen beispielsweise aus Metall, Glas, Keramiken oder/und Kunststoff aufweisen. Besonders bevorzugt sind Träger mit Glas oder/und Silicioberflächen. Die Träger können weiterhin jede beliebige Form aufweisen, z.B. Mikropartikel wie etwa magnetische Mikropartikel oder Halbleitermaterialien wie Biochips, z.B. DNA- oder RNA-Chips, die gegebenenfalls mehrere mit Nukleinsäuren spezifisch bindefähige definierte Flächen in Form von Array-Anordnungen enthalten können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragmente können auch in Form eines Gemisches unterschiedlicher Fragmente an einen Träger gekoppelt werden. Auf diese Weise werden Träger mit statistisch darauf angeordneten Nukleinsäurefragmenten erzeugt. Dies hat Vorteile, wenn z.B. eine anschließende Amplifikation auf der Trägeroberfläche mit Primern durch-

führt, die für eine vorbestimmte Nukleinsäuresequenz, z.B. in Gen  
kodi ren.

Wenn bei der Spaltung der Nukleinsäuren ein heterogenes Nukleinsäurege-  
misch entsteht, kann dieses zur Herstellung einer Nukleinsäurebibliothek,  
insbesondere einer statistischen Bibliothek verwendet werden. Solche  
Bibliotheken können auch durch multiplen statistischen Einbau von  
Verbindungen der Formel (I) in einen Nukleinsäurestrang gefolgt von einer  
ortsspezifischen Spaltung erzeugt werden. Außerdem können zur Erzeugung  
statistischer Nukleinsäurebibliotheken auch degenerierte und statistisch an  
Nukleinsäurematrizen bindende Primer eingesetzt werden.

Die Fragmente der Nukleinsäurebibliothek können kombinatorisch ohne oder  
nach weiterer enzymatischer oder chemischer Behandlung wieder zu-  
sammengesetzt werden (DNA-Shuffling). Da bei jedem Fragment das 5'-  
Ende mit einer Gruppe Y versehen ist (mit Ausnahme des 5'-Endes des  
ersten Fragments), kann das Zusammensetzen anderer Fragmente nur so  
erfolgen, daß das ursprüngliche erste Fragment wiederum das erste  
Fragment bildet. Den vollständigen kombinatorischen Raum kann man nach  
weiterer enzymatischer oder chemischer Behandlung der Bibliothek oder  
einzelne Fragmente daraus ausnutzen.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugten Nukleinsäurefrag-  
mente können nach der ortsspezifischen Spaltung einer Nachweisreaktion  
unterzogen werden. Diese Nachweisreaktion kann mit beliebigen, für diesen  
Zweck bekannten Methoden erfolgen. Vorzugsweise wird eine massenspek-  
trometrische Analyse oder/und eine Elektrophorese, z.B. eine Polyacrylamid-  
gelelektrophorese, durchgeführt.

Die Nachweisreaktion kann beispielsweise zum Nachweis von Mutationen,  
z.B. von Punktmutationen in Nukleinsäuren eingesetzt werden. Zwei

Protokolle zur Analyse von Punktmutationen werden im folgenden ausführlich beschrieben.

5 Eine weitere wichtige Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Nukleinsäuresequenzierung. Solche Sequenzierverfahren können in unterschiedlichen Varianten durchgeführt werden. Beispielsweise ist das erfindungsgemäße Verfahren auch für eine "Cycle"-Sequenzierung in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikation oder/und für eine bidirektionale Sequenzanalyse auf einem Nukleinsäurestrang geeignet. Bevorzugte  
10 Beispiele von Sequenzierverfahren werden im folgenden ausführlich beschrieben.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) gegebenenfalls in Kombination mit  
15 pharmazeutisch verträglichen Träger-, Hilfs- oder/und Füllstoffen enthält. Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die als wirksame Komponente eine Nukleinsäure, in die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) eingebaut ist, sowie  
20 gegebenenfalls pharmazeutisch verträgliche Träger-, Hilfs- oder/und Füllstoffe enthalten. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen sind als Mittel für die Gentherapie, als antivirale Mittel, als Antitumormittel oder für Antisense-Anwendungen geeignet. So können Nuklease-resistente 5'-Aminoverbindungen oder diese Verbindungen enthaltende Nukleinsäuren in  
25 lebende Zellen eingebracht und dort von zellulären oder/und viralen Enzymen, z.B. Polymerasen oder Reverse Transkriptasen, in Nukleinsäuren eingebaut werden. Wenn die zelluläre Polymerase beispielsweise nicht in der Lage ist, die modifizierten Gene abzulesen und selbst die modifizierten Triphosphate als Substrate nicht akzeptiert, kann die virale genetische  
30 Information nicht amplifiziert werden. Weiterhin führt der Einsatz der 5'-modifizierten 5'-Nukleosidtriphosphate zu einer Zersetzung der viralen Gene,

da die eingeführte P-Y-Bindung, insbesondere die P-N-Bindung unter physiologischen Bedingungen labil ist.

5 Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäurefragmenten umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Nukleinsäure, die mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) als monomeren Baustein enthält und
- (b) ortsspezifisches Spalten der Nukleinsäure.

10 Erfindungsgemäße Verbindungen der Formel (I) können als Bestandteile von Reagenzienkits zum Nachweis von Nukleinsäuren, z.B. als Sequenzierungskits oder als Kits zur Mutationsanalyse gegebenenfalls mit weiteren Nachweiskomponenten verwendet werden. Diese weiteren Nachweiskomponenten sind beispielsweise Enzyme, insbesondere Polymerasen wie etwa  
15 DNA-Polymerasen oder Reverse Transkriptasen, als Primer verwendbare Oligonukleotide, die gegebenenfalls an ihrem 5'-Ende oder/und an ihrer Seitenkette eine Markierung tragen können, Deoxynukleosidtriphosphate, die gegebenenfalls eine Markierung tragen können, Dideoxynukleosidtriphosphate (Kettenabbruchmoleküle), die gegebenenfalls eine Markierung  
20 tragen können, sowie weitere Reagenzien, z.B. Puffer etc. und feste Träger. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Reagenzienkits die in den nachfolgenden Figuren angegebenen Bestandteile

25 Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert:

Es zeigen:

30 Fig. 1 die schematische Darstellung der Synthese 5'-Amino-modifizierter Nukleoside;

Fig. 2 die schematische Darstellung der Herstellung von 5'-Amino-modifizierten Nukleosidtriphosphaten;

- Fig. 3 die schematische Darstellung der Erzeugung 5'-Amino-modifizierter oder/und 3'-phosphorylierter DNA-Fragment durch ortsspezifische Spaltung der P-N-Bindung bei eingebauten 5'-Aminonukleosid-triphosphaten;
- 5 Fig. 4 die schematische Darstellung einer selektiven 5'- oder 3'-Markierung von Nukleinsäurefragmenten;
- Fig. 5 die schematische Darstellung der Abspaltung von Nukleinsäuren von festen Trägern;
- Fig. 6 die schematische Darstellung eines Sequenzierprotokolls unter  
10 Verwendung eines 5'-Farbstoff-markierten Sequenzierprimers;
- Fig. 7 ein alternatives Verfahren zur Erzeugung sequenzierbarer Fragmente durch Exonukleaseverdauung;
- Fig. 8 die schematische Darstellung einer elektrophoresefreien iterativen Sequenziermethode;
- 15 Fig. 9 die schematische Darstellung einer bidirektionalen Sequenziermethode an einem einzigen Nukleinsäurestrang;
- Fig. 10 die Markierung der Nukleinsäurefragmente nach der Sequenzierreaktion durch Terminale Transferase;
- Fig. 11 eine erste Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen;  
20
- Fig. 12 eine zweite Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen und
- Fig. 13 die Erzeugung einer DNA Bibliothek.
- 25 Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I), worin Y eine Aminogruppe darstellt, sind in Fig. 1a und b gezeigt. Fig. 1a zeigt ein Schema zur Herstellung von 5'-Amino-2',5'-dideoxypurinnukleosiden. Hierzu werden die Aminogruppen der Nukleobase durch Reaktion mit Schutzgruppen blockiert, z.B. durch Silylierung mit Trimethylsilylchlorid und anschließende Einführung einer Bz- oder Ibu-Schutzgruppe. Dann wird  
30 die 5'-OH-Gruppe aktiviert, z.B. durch Umsetzung mit Tosylchlorid, so daß sie mit einem Alkalimetallazid, z.B.  $\text{LiN}_3$ , reagieren kann. Nach Abspaltung

der Schutzgruppen, z.B. durch  $\text{NH}_3/\text{MeOH}$ , kann die Schutzgruppe reduktiv, z.B. mit  $\text{H}_2/\text{PtO}_2$ , in eine Aminogruppe überführt werden.

In Fig. 1b ist ein entsprechendes Syntheschema zur Herstellung von 5'-Amino-2',5'-dideoxypyrimidinnukleosiden dargestellt. Thymidin kann beispielsweise direkt mit einem Azidsalz, z.B.  $\text{NaN}_3$  umgesetzt und anschließend die Azidgruppe reduktiv in eine Aminogruppe überführt werden. Bei Cytidin wird zunächst die Nukleobase durch eine Schutzgruppe, z.B. Bz, blockiert und anschließend kann auf analoge Weise wie bei Thymidin eine Azidgruppe eingeführt werden, die reduktiv zu einer Aminogruppe umgesetzt werden kann.

In Fig. 2 ist ein Syntheschema zur Herstellung von 5'-Amino-2',5'-dideoxynukleosid-5'-triphosphaten gezeigt, mit dem auf einfache Weise eine Triphosphatgruppe an die gemäß Fig. 1 erhaltenen Nukleoside angefügt werden kann. Die auf diese Weise hergestellten 5'-Aminonukleosidtriphosphate können als Monomerbausteine für den Einbau in Nukleinsäuren verwendet werden.

Ausführliche Angaben zur Ausführung dieser Reaktionen finden sich in Beispiel 1.

Fig. 3 zeigt die Erzeugung von modifizierten DNA-Fragmenten, die einen 5'-Amino-T-Baustein enthalten und die anschließende Spaltung dieser DNA-Fragmente an der P-N-Bindung, wobei 3'-phosphorylierte oder/und 5'-Amino-modifizierte DNA-Fragmente erhalten werden.

Fig. 4 zeigt Beispiele für eine selektive 5'- und 3'-Markierung der durch die Spaltung erzeugten Nukleinsäurefragmente.

Fig. 5 zeigt die Synthese von 5'-Aminonukleotidbausteinen enthaltenen DNA-Molekülen an einen festen Träger und die anschließende Freisetzung 5'-Amino-modifizierter DNA-Fragmente durch Spaltung der P-N-Bindung.

- 5 Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführungsform des 5'-Aminosequenzierverfahrens. Gemäß der gezeigten Ausführungsform wird ein am 5'-Ende eine Markierungsgruppe tragender Primer verwendet, der durch enzymatische Polymerisation verlängert wird, wobei 5'-Amino-modifizierte Nukleotide an statistischen Positionen in den Nukleinsäurestrang  
10 eingebaut werden. Die modifizierten Nukleotide werden von DNA Polymerasen, z.B. von der T7 DNA Polymerase, als Substrate akzeptiert. Die P-N-Bindungen sind statistisch über den Nukleinsäurestrang verteilt und können auf einfache Weise, z.B. durch Pyrolyse, saure Bedingungen oder/und Mikrowellenbehandlung gespalten werden, wobei ein Gemisch an Nukleinsäurefragmenten entsteht. Jedes dieser Fragmente trägt an seinem 3'-  
15 Ende eine Phosphatgruppe, wodurch Mobilitätsänderungen bei einer Gelelektrophorese vermieden werden. Bei Einbau von Verbindungen der Formel (I), bei denen X eine nachweisbare Gruppe, z.B. eine Farbstoffgruppe bedeutet, werden nach Spaltung Nukleinsäurefragmente erhalten, die an  
20 ihrem 3'-Nukleotid eine Markierung aufweisen.

Auch für eine "Cycle"-Sequenzierung können die modifizierten Nukleotide eingesetzt werden. Unter Verwendung thermostabiler Polymerasen ist es möglich, die DNA-Matrize beispielsweise durch PCR zunächst zu amplifizieren und dann die modifizierten Nukleotide bei 37°C mit T7 DNA  
25 Polymerase einzubauen. Die Spaltung erfolgt dann direkt im Reaktionsgefäß durch einfaches Erhitzen auf beispielsweise 95°C. Alternativ kann der Einbau der modifizierten Nukleotide schon während der Amplifikation selbst durch eine thermostabile Polymerase erfolgen.

30

Nach der Spaltung wird das Reaktionsgemisch oder ein Teil davon einer Nachweisanalyse, z.B. durch Gelelektrophorese, unterzogen. Auf diese

Weise werden Probleme hinsichtlich der Substratspezifität bei Farbstoffmarkierten Kettenabbruchmolekülen vermieden. Verglichen mit bisher verfügbaren chemisch-enzymatischen Methoden, z.B. durch Einbau von  $\alpha$ -Thionukleotiden, erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren eine einfachere  
5 Spaltung der erzeugten Nukleinsäurestränge, ohne daß aggressive Chemikalien verwendet werden müssen, die die Markierungsgruppe des Primers bzw. die glykosidische Bindung angreifen könnten. Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die Kosten von bestehenden Sequenzierprotokollen verringert werden, da die Triphosphate auf sehr einfache  
10 Weise, z.B. durch den Anwender selbst, direkt vor der Sequenzierung herstellbar sind. Das Verfahren ist schnell, einfach und funktioniert selbst mit einer sehr geringen Menge an DNA-Ausgangsmaterial.

Fig. 7 zeigt eine alternative Methode zur Erzeugung von sequenzierbaren  
15 Nukleinsäurefragmenten durch 3'→5'-Exonukleaseverdau, z.B. durch Schlangengiftphosphodiesterase.

Fig. 8 zeigt ein Beispiel für eine Elektrophorese- oder/und Gel-freie iterative Sequenziermethode. Dabei werden farbstoffmarkierte 5'-Amino-modifizierte  
20 Deoxy-nukleosidtriphosphate verwendet, wobei jedes Nukleotid eine unterschiedliche Markierungsgruppe trägt. Durch die DNA Polymerase wird ein einziges Farbstoff-markiertes Amino-modifiziertes Nukleosid an den Primer angefügt und anschließend spezifisch an der P-N-Bindung wieder abgespalten. Die Art des angelagerten Nukleotids kann durch die nachgewiesene  
25 Markierungsgruppe identifiziert werden. Anschließend kann das identifizierte Nukleotid in unmodifizierter Form durch die Polymerase angefügt und der zuvor beschriebene Sequenzierschritt wiederholt werden. Ein Mehrfacheinbau desselben Nukleotids kann durch die Intensität der Markierung, z.B. einer Fluoreszenzmarkierung, nachgewiesen werden.

30

Fig. 9 zeigt ein bidirektionales Sequenzierprotokoll innerhalb eines einzigen Nukleinsäurestrangs. Hierzu werden wie zuvor beschrieben 5'-Amino-



markierte Nukleoside in Nukleinsäurestränge eingebaut. Die Termination der Elongation erfolgt durch Zugabe von Kettenabbruchmolekülen, z.B. ddNTPs. Durch Restriktionsspaltungen können dann definierte 3'-Enden der Nukleinsäurestränge erzeugt werden. Durch Zugabe eines mit einer zweiten

5 Markierungsgruppe versehenen Kettenabbruchmoleküls, z.B. eines ddNTPs, und Terminaler Transferase werden Nukleinsäurestränge erhalten, die an ihrem 5'- bzw. 3'-Ende jeweils zwei, vorzugsweise unterschiedliche Markierungsgruppen tragen. Nach Spaltung der P-N-Bindungen werden zwei

10 Sätze von unterschiedlich markierten DNA-Fragmenten erhalten, die in einer einzigen Sequenzreaktion nebeneinander nachweisbar sind.

Fig. 10 zeigt eine 3'-terminale Einführung von Markierungsgruppen. Hierzu werden zunächst durch Polymerisation unter Verwendung von Aminotriphosphaten Nukleinsäurestränge hergestellt, die anschließend an der P-N-

15 Bindung gespalten werden. Die resultierenden Nukleinsäurefragmente mit 3'-Phosphatgruppen werden dephosphoryliert und durch Zusatz eines eine Markierungsgruppe tragenden Kettenabbruchmoleküls, z.B. eines 5'-Amino-ddNTPs, und Terminaler Transferase markiert. Auf diese Weise kann eine Sequenzierungsreaktion in Abwesenheit jeglicher Art von Markierungs-

20 gruppen durchgeführt werden. Der Einbau der Markierungsgruppen in die zu sequenzierenden DNA Fragmente erfolgt erst nach Abschluß der Sequenzierungsreaktion. So werden Probleme hinsichtlich der Substratspezifität von Polymerasen vermieden und eine Verringerung der Kosten erreicht, da die Verwendung markierter Primermoleküle überflüssig wird.

25

Fig. 11 zeigt eine erste Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen. Dabei wird ein Nukleinsäureprimer verwendet, dessen 3'-Ende sich unmittelbar "stromaufwärts" der potentiellen Mutationsstelle befindet. Durch Zugabe eines mit einer Markierungsgruppe versehenen 5'-Amino-

30 modifizierten Nukleosidtriphosphats in Gegenwart einer Polymerase erfolgt eine Elongation des Primers um mindestens ein Nukleotid, sofern auf dem Matrizenstrang das zu dem jeweils verwendeten modifizierten Nukleosid-

triphosphat komplementäre Nukleotid vorliegt. Der Einbau des Amino-modifizierten markierten Nukleotids in den DNA-Strang oder das Ausbleiben dieses Einbaus läßt sich auf einfache Weise durch bekannte Methoden nachweisen. Hierzu kann das nichteingebaute Nukleotid z.B. durch  
5 Zentrifugation oder - bei Bindung an eine Festphase - durch Waschen entfernt und dann der Nachweis der Markierung in an den Primer gebundener Form oder/und nach Abspaltung erfolgen.

Fig. 12 zeigt eine weitere Ausführungsform zum Nachweis von Punktmutationen. Hierzu wird ein trägergebundener Primer verwendet, der eine  
10 interne Markierungsgruppe trägt. Dann werden 5'-Amino-modifiziertes Nukleosidtriphosphat und Polymerase zugegeben. Bei Vorliegen einer bestimmten Nukleobase auf dem Matrizenstrang erfolgt eine Elongation des Primers, ansonsten wird kein 5'-Aminonukleosidtriphosphat an den Primer  
15 angefügt. Der Reaktionsansatz wird anschließend mit einer 3'→5'-Exonuklease behandelt. Nach Anfügen des 5'-Amino-modifizierten Nukleotids an den Primer findet aufgrund der P-N-Bindung kein enzymatischer Abbau durch die Exonuklease statt und die im Primer eingebaute Markierungsgruppe bleibt am festen Träger immobilisiert. Wenn hingegen kein 5'-Amino-modifiziertes  
20 Nukleosidtriphosphat an den Primer angefügt wird, wird dieser durch die Exonuklease abgebaut und die Markierung vom festen Träger abgespalten. Das Verbleiben der Markierung am Träger oder deren Freisetzung kann ohne weiteres durch bekannte Methoden nachgewiesen werden.

25 Fig. 13 zeigt die Erzeugung einer DNA-Bibliothek durch multiplen 5'-Aminodeoxynukleosidtriphosphat-Einbau in DNA Fragmente. Durch Spaltung der P-N-Bindungen wird eine Vielzahl unterschiedlicher DNA Fragmente erzeugt, die entweder an einen Träger gebunden werden können oder beispielsweise durch Massenspektrometrie analysiert werden können.

**Beispiel I****1. Synthese von modifizierten Nukleosiden**

5 Die Synthese modifizierter Nukleoside wurde in Anlehnung an Mag et al (25) durchgeführt. 5'-Amino-5'-deoxythymidin-5'-triphosphat und 5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin-5'-triphosphat wurden gemäß Yamamoto et al (26) mittels Substitution der 5'-Hydroxylgruppe durch eine Azidgruppe gefolgt von katalytischer Reduktion zum entsprechenden Amin synthetisiert. Die  
10 entsprechenden Guanosin- und Adenosin-Derivate wurden durch Tosylierung der 5'-Hydroxylgruppe und Substitution der Tosylgruppe mit Lithiumazid hergestellt, um N<sup>1</sup>-C<sup>5</sup>-Cyclisierungsreaktionen zu vermeiden. Die Purin-Azidverbindungen wurden ebenfalls durch katalytische Hydrierung reduziert. Nach Schutzgruppenabspaltung wurden die Nukleoside gemäß der  
15 von Letsinger et al (27) beschriebenen Methode mit Trinatriumtrimetaphosphat triphosphoryliert.

**1.1 N<sup>4</sup>-Benzoyl-2'-deoxycytidin**

20 1 Äquivalent 2'-Deoxycytidin wurde in wasserfreiem Pyridin gelöst. Hierzu wurden 5 Äquivalente Trimethylchlorsilan bei Raumtemperatur gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt, auf 0°C abgekühlt und tropfenweise mit 1,2 Äquivalenten Benzoylchlorid versetzt. Das Gemisch wurde erst 30 min und dann weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.  
25 Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml kaltem Wasser bei 0°C gestoppt. Nach 20 min wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der verbleibende Rückstand in heißem Wasser gelöst und dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde auf 4°C abgekühlt und die resultierenden Kristalle durch Filtration und Waschen mit kaltem Wasser  
30 gewonnen. Das Produkt wurde bei 50°C über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> unter Vakuum auf konstantes Gewicht getrocknet.

N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-deoxyadenosin und N<sup>2</sup>-Isobuturyl-2'-deoxyguanosin wurden nach der gleichen Vorschrift hergestellt.

## 1.2 5'-Azido-5'-deoxythymidin

5  
7,26 g (30 mmol) Thymidin, 9,45 g (36 mmol) Triphenylphosphin, 5,85 g (90 mmol) Natriumazid und 11,94 g (36 mmol) Tetrabrommethan wurden in 120 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde mit 150 ml Natriumhydrogencarbonat-  
10 Lösung gewaschen und die wässrige Phase wurde mit viermal 200 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Silicagelchromatographie mit einem Gradienten von 0 bis 10% Methanol in Dichlormethan gereinigt. Die Ausbeute war  
15 etwa 76% (6,09 g).

### Analyse:

DC: R<sub>f</sub>: 0,40 (Chloroform: Methanol = 9:1; Silicagel 60, F<sub>254</sub>, Merck)

20

IR:  $\nu_{\text{as}}(\text{N}_3) = 2093,7 \text{ cm}^{-1}$  (s, KBr)

NMR:  $\delta$ -<sup>1</sup>H[ppm], 270 MHz, 300 K, DMSO-d<sub>6</sub>:

11,30 (s, 1 H, N<sup>3</sup>H); 7,47 (s, 1H, H<sup>6</sup>); 6,18 (t, 1H, H<sup>1</sup>); 5,39 (d,  
25 1H, O<sup>3</sup>H);

4,22 (m, 1H, H<sup>3'</sup>); 3,85 (m, 1H, H<sup>4'</sup>); 3,55 (d, 2H, H<sup>5'1</sup>, H<sup>5'2</sup>); 2,29 (m,  
1H, H<sup>2'2</sup>);

2,08 (m, 1H, H<sup>2'1</sup>); 1,79 (d, 3H, C<sup>5</sup>-CH<sub>3</sub>)

30

### Elementaranalyse:

ber chnet: C: 44,94% H: 4,90% N: 26,21%

g funden: C: 44,77% H: 4,86% N: 25,93%

5'-Azido-N<sup>4</sup>-benzoyl-2',5'-dideoxycytidin wurde nach der gleichen Vorschrift hergestellt.

5

### 1.3 5'-Azido-2',5'-dideoxycytidin

5'-Azido-N<sup>4</sup>-benzoyl-2',5'-dideoxycytidin wurde in einer gesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol gelöst und bei Raumtemperatur für 12 h gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand chromatographisch unter Verwendung von Dichlormethan mit einem Gradienten von 0 bis 15% Methanol als Elutionsmittel gereinigt.

10

### 1.4 5'-O-(4-Methylbenzolsulfon)-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-deoxyadenosin und 5'-O-(4-Methylbenzolsulfon)-N<sup>2</sup>-isobutyryl-2'-deoxyguanosin

15

Jeweils 1 Äquivalent N<sup>6</sup>-Benzoyl-2'-deoxyadenosin und N<sup>2</sup>-Isobutyryl-2'-deoxyguanosin wurden in trockenem Pyridin gelöst. Dazu wurden bei Raumtemperatur 3 Äquivalente 4-Methylbenzolsulfonylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 min gerührt, dann auf Eis gekühlt und mit 5 ml Wasser abgeschreckt. Nach 15 min wurde die Lösung eingedampft und der ölige Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde zweimal mit 5% NaHCO<sub>3</sub>, Wasser und gesättigter Salzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde chromatographisch unter Verwendung eines Gradienten von 0 bis 10% Methanol in Dichlormethan als Elutionsmittel gereinigt.

20

25

### 1.5 5'-Azido-2',5'-dideoxyadenosin und 5'-Azido-2',5'-dideoxyguanosin

30 Jeweils 1 Äquivalent der in Beispiel 1.4 hergestellten Verbindungen wurde in trockenem N,N-Dimethylformamid aufgenommen und mit fünf Äquivalenten Lithiumazid versetzt. Die Lösung wurde für 5 h bei 50°C gerührt. Dann

wurde das fünffache Volumen an Dichlormethan zugesetzt und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Die Schutzgruppen-  
abspaltung und Reinigung der Rohprodukte erfolgte wie bei der Herstellung  
5 von 5'-Azido 2',5'-dideoxycytidin beschrieben.

### 1.6. 5'-Amino 5'-deoxythymidin

150 ml absoluter Methanol wurden durch fünfmaliges Einfrieren und  
10 Auftauen unter Vakuum entgast. Darin wurden 1,5 g (5,62 mmol) 5'-Azido-  
5'-deoxythymidin gelöst und eine geringe Menge an Platindioxid-Hydrat-  
Katalysator zugesetzt. Wasserstoffgas wurde in die Lösung eingeleitet und  
das Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration durch  
Cellite wurde das Lösungsmittel entfernt. Eine weitere Aufreinigung war  
15 nicht erforderlich. Die Ausbeute war nahezu quantitativ.

#### Analyse:

DC:  $R_f$ : 0,05 (Dichlormethan:Methanol = 9:1; Silicagel 60 F<sub>254</sub>, Merck)

20

IR:  $\nu_{\text{as}}$  ( $\text{N}_3$ ) = nicht vorhanden (KBr)

NMR:  $\delta$ - $^1\text{H}$  [ppm], 270 MHz, 300 K, DMSO- $d_6$ :

7,63 (s, 1H,  $\text{H}^6$ ); 6,15 (t, 1H,  $\text{H}^1$ ); 5,15 (d, 1H,  $\text{O}^3\text{H}$ ); 4,21 (m,  
25 1H,  $\text{H}^3$ );  
3,65 (m, 1H,  $\text{H}^4$ ); 2,73 (d, 2H,  $\text{H}^{5'1}$ ,  $\text{H}^{5'2}$ ); 1,95-2,15 (m, 2H,  $\text{H}^{2'1}$ ,  
 $\text{H}^{2'2}$ ); 1,79 (d, 3H,  $\text{C}^5\text{-CH}_3$ )

Massenspektrometrie: ESI (+) berechnet: 242,2 Da  
30 gefunden: 242,1 Da

5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin, 5'-Amino-2',5'-dideoxyadenosin und 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin wurden nach der gleichen Vorschrift hergestellt.

### 1.7 5'-Amino-5'-deoxythymidin-5'-triphosphat

5

2 mg (1 Äquivalent) 5'-Amino-5'-deoxythymidin und 13,4 mg (5 Äquivalente) Trinatriumtrimetaphosphat wurden in 100 µl sterilem Wasser (pH 8,50) aufgelöst, 30 h bei Raumtemperatur gerührt und dann bei -80°C aufbewahrt. Für die Sequenzierungsexperimente wurde ein Aliquot direkt ohne  
10 weitere Reinigung aus dem Reaktionsgemisch entnommen.

5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin-5'-triphosphat, 5'-Amino-2',5'-dideoxyadenosin-5'-triphosphat und 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanoasin-5'-triphosphat wurden nach der gleichen Synthesevorschrift hergestellt.

15

### Analyse

Massenspektrometrie: ESI(-):

20 5'-Amino-2',5'-dideoxyadenosin-5'-triphosphat:

berechnet: 490,199 Da

gefunden: 488,8 Da (M-H);

510,9 Da (M-2H + Na);

532,7 Da (M-2H + 2Na)

25

5'-Amino-2',5'-dideoxycytidin-5'-triphosphat:

berechnet: 466,173 Da

gefunden: 464,8 Da (M-H);

486,8 Da (M-2H + Na)

30

5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin-5'-triphosphat:

berechnet: 506,198 Da

gefunden: 504,8 Da (M-H);  
526,8 Da (M-2H + Na)  
548,7 Da (M-3H + 2Na)

5 5'-Amino-5'-deoxythymidin-5'-triphosphat:

berechnet: 481,184 Da

gefunden: 479,9 Da (M-H);

480,6 Da (M);

501,8 Da (M-2H + Na)

10 523,8 Da (M-3H + 2Na)

## 2. Sequenzierungsreaktion

Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion ist am Beispiel der T-Spur  
15 dargestellt. Die Sequenzierungsreaktion für die A-, C- und G-Spuren kann  
auf analoge Weise erfolgen werden.

Pro Ansatz wurden 0,3  $\mu$ l Primer, z.B. Universal- oder Reverseprimer  
(Fluoresceinisothiocyanat-markiert; 2  $\mu$ M), 0,3  $\mu$ l DMSO, 1,2  $\mu$ l ss-M13  
20 MP18 (+) DNA und 0,6  $\mu$ l Annealingpuffer (1 M Tris-HCl pH 7,6; 100 mM  
MgCl<sub>2</sub>) zusammengegeben. Die Lösung wurde 3 min bei 70°C inkubiert und  
über eine Zeitdauer von 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zu dieser Lösung wurden 0,60  $\mu$ l einer dNTP-Mischung (jeweils 250  $\mu$ M  
25 dATP, dCTP und dGTP sowie 50  $\mu$ M dTTP), 0,44  $\mu$ l 5'-Amino-dTTP (aus der  
Reaktionsmischung von Beispiel 1.7) und 0,25  $\mu$ l T7 Polymerase (8 U/ $\mu$ l)  
zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Für die A-, C- und G-Spuren  
wurden entsprechend 5'-Amino-dATP, 5'-Amino-dCTP oder 5'-Amino-dGTP  
verwendet.

30

Anschließend werden 4  $\mu$ l Stopplösung (95% deionisiertes Formamid, 20 mM  
EDTA, 0,05% Xylencyanol; 0,05% Bromphenolblau) zugegeben.



Zur Herstellung eines sequenzierbaren Gemisches an Nukleinsäure fragmentiert wurden die P-N-Bindungen gespalten. Hierzu stehen folgende alternative Methoden zur Verfügung:

- 5     1.     Spaltung durch Temperaturerhöhung:  
          40 minütiges Erwärmen auf 95°C (auch 20-minütiges Erwärmen ist möglich)
- 10    2.     Spaltung unter sauren Bedingungen:  
          Zugeben von 2 bis 5 µl 1 N HCl, fünfminütiges Inkubieren bei Raumtemperatur, Neutralisieren mit 2 bis 5 µl 1 N NaOH, fünfminütiges Denaturieren bei 95°C
- 15    3.     Spaltung durch Mikrowellen:  
          Behandeln der Probe mit Mikrowellenstrahlung für 30 min bei 900 W.

Alternativ hierzu können auch enzymatische Spaltungsmethoden durch Exo- bzw. Endonukleasen, insbesondere durch 3'→5'-Exonukleasen wie etwa 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase verwendet werden. Hierzu werden

20    10 mU (3,2 µl) 3'→5'-Schlangengiftphosphodiesterase zugegeben, für 10 min 40°C inkubiert und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Anschließend wurde das Fragmentgemisch analysiert, z.B. durch Polyacrylamidgelelektrophorese. Hierzu wurden 5 µl des Reaktionsansatzes auf

25    das Gel geladen. Alternativ kann der Reaktionsansatz bei -20°C aufbewahrt und dann vor dem Aufbringen auf das Gel für 3 min bei 95°C denaturiert werden.

**Literaturverzeichnis:**

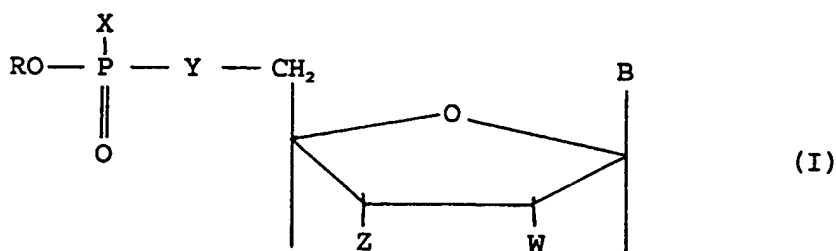
- (1) Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467, 1977
- (2) Piele, U., Zürcher, W., Schär, M., Moser, H.E., *Nucl. Acids. Res.* 21, 3191-3196, 1993
- (3) a) Jones, D.H., *BioTechniques* 22, 938-946, 1997  
b) Brenner, S., WO 95/27080, 1995
- (4) Ronaghi, M., Kharamouhamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P., *Anal. Biochem.* 242, 84-89, 1996
- (5) Maxam, A.M., Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 560-564, 1977
- (6) a) Gish, G., Eckstein, F., *Science* 240, 1520-1522, 1988  
b) Nakayama, K.L., Gish, G., Eckstein, F., Vosberg, H.-P., *Nucl. Acids Res.* 16, 9947-9959, 1988  
c) Labeit, S., Lehrach, H., Goody, R.S., *DNA* 5, 173-177, 1986  
d) Porter, K.W., Briley, J.D., Ramsay Shaw, B., *Nucl. Acids Res.* 25, 1611-1617, 1997
- (7) a) Barnes, W.M., *J. Mol. Biol.* 119, 83-99, 1978  
b) Hamilton, R.T., Wu, R., *J. Biol. Chem.* 249, 2466-2472, 1974
- (8) a) Canard, B., Sarfati, R.S., *Gene* 148, 1-6, 1994  
b) Canard, B., Sarfati, S., PCT Int. Appl. WO 94 23064; PCT/FR94/00345, 1994
- (9) a) Dramanc, R., Labat, I., Bruckner, I., Crkvenjakov, R., *Genomics* 4, 114-128, 1989  
b) Dramanc, R., Dramanc, S., Stroszka, Z., Paunesku, T., Labat, I., Zeremski, M., Snoddy, J., Funkhouser, W.K., Koop, B., Hood, L., Crkvenjakov, R., *Science* 260, 1649-1652, 1993  
c) Bains, W., Smith, G.C., *J. Theor. Biol.* 135, 303-307, 1988
- (10) a) Baldwin, M.A., *Natural Products reports*, 33-44, 1995;  
b) Wolter, M.A., Engels, J.W., *Eur. Mass Spektrom.* 1, 583-590, 1995

- c) Nordhoff, E., Karas, M., Cramer, R., Hahner, S., Hillenkamp, F., Kirpekar, F., Lezius, A., Muth, J., Meier, C., Engels, J.W., *J. Mass Spectrom.* 30, 99-112, 1995
- d) Little, D.P., Chorus, R.A., Speir, J.P., Senko, M.W., Kelleher, N.L., McLafferty, F.W., *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4893-4897, 1994
- e) Grotjahn, L., Frank, R., Blöcker, H., *Nucl. Acids Res.* 10, 4671-4678, 1983
- (11) Löber, G., Kittler, L., *PhiuZ* 27, 113-117, 1996
- (12) a) Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., *J. Biochem. Biophys. Meth.* 13, 315-323, 1986  
b) Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P. Dodd, C., Conell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E., *Nature* 321, 674-679, 1986
- (13) Voss, H., Schwager, C., Wirkner, U., Zimmermann, J., Erfle, H., Hewitt, N.A., Rupp, T., Stegemann, J., Ansorge, W., *Meth. Mol. Cell. Biol.* 3, 30-34, 1992
- (14) Lee, L.G., Connel, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D., Wilson, R., *Nucl. Acids Res.* 20, 2471-2483, 1992
- (15) Murray, V., *Nucl. Acids Res.* 17, 8889, 1989
- (16) Rosenthal, A., Coutelle, O., Craxton, M., *Nucl. Acids Res.* 21, 173-174, 1993
- (17) Amersham Lief Science product catalogue 1996, 89
- (18) Kilger, C., Pääbo, S., *Biol. Chem.* 378, 99-105, 1997
- (19) Smith, L.M., Fung, S., Hunkapillar, T.J., Hood, L.E., *Nucl. Acids Res.* 13, 2399-2412, 1985
- (20) Current protocols in Molecular Biology, Vol 1, Section 3.10, John Wiley and Sons, Series Editor: Virginia Benson Chanda
- (21) Bruick, R.K., Koppitz, M., Joyce, G.F., Orgel L.E., *Nucl. Acids Res.* 25, 1309-1310, 1997

- (22) Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Handbook, second edition, Dynal, Oslo, Norway, 156-157
- (23) Landegren, U., Laboratory protocols for mutation detection, Oxford University Press, 1996, ISBN 0-19-857795-8
- (24) Nikiforov, T.T., Rendle, R., B., Goelet, B., Rogers, Y-H., Kotewicz, M., L., Anderson, S., Trainor, G., L., Knapp, M.R., Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms, *Nucl. Acids Res.* 22, 4167-4175, 1994
- (24a) Alexandrova, L.A., Skoblov, A.Y., Jasko, M.V., Victorova, L.S., Krayevsky, A.A., *Nucl. Acids Res.* 26, 778-786, 1998
- (25) Mag, M., Engels, J.W., *Nucl. Acids Res.* 17, 5973-5988, 1989
- (26) Yamamoto, J., Sekine, M., Hata, T., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1, 306-310, 1980
- (27) Letsinger, R.L., Wilkes, J.S., Dumas, L.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 292-293, 1972

# Ansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I):



worin:

B eine Nukleobase bedeutet,

15 W und Z jeweils  $OR^1$ ,  $SR^1$ ,  $N(R^1)_2$  oder  $R^1$  bedeuten,  
wobei  $R^1$  jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen  
Wasserstoff oder einen organischen Rest darstellt,

X  $OR^2$ ,  $SR^2$  oder  $B(R^2)_3$  bedeutet,  
wobei  $R^2$  jeweils unabhängig Wasserstoff, ein Kation oder  
20 einen organischen Rest bedeutet,

Y  $NR^3$  oder S bedeutet, wobei  $R^3$  Wasserstoff oder einen  
organischen Rest darstellt und

R Wasserstoff, ein Kation, einen organischen Rest oder eine  
gegebenenfalls modifizierte Phosphat- oder Diphosphatgruppe  
25 bedeutet,

zum Einbau in Nukleinsäuren und zur anschließenden ortsspezifischen  
Spaltung der Nukleinsäuren.

2. Verwendung nach Anspruch 1,

30 dadurch gekennzeichnet,

daß der Einbau enzymatisch erfolgt.

3. Verwendung nach Anspruch 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß das Enzym ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus DNA-  
abhängigen DNA Polymerasen, DNA-abhängigen RNA Polymerasen,  
5 RNA-abhängigen DNA Polymerasen, RNA-abhängigen RNA Polymere-  
sen und Terminalen Transferasen.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß die ortsspezifische Spaltung erfolgt durch:  
(i) Temperaturerhöhung,  
(ii) Einstellen saurer Bedingungen,  
(iii) Mikrowellenbehandlung,  
(iv) Laserbehandlung oder/und  
15 (v) enzymatischem Verdau.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Einbau der Verbindungen in Kombination mit einer Nu-  
20 kleinsäureamplifikationsreaktion erfolgt.
6. Verwendung nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nukleinsäureamplifikation eine PCR umfaßt.  
25
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Einbau der Verbindungen in trägergebundene Nukleinsäuren  
erfolgt.  
30

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß in die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente eine  
oder mehrere Markierungsgruppen eingebaut werden.
- 5
9. Verwendung nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Markierungsgruppen am 5'- oder/und 3'-Ende der Nukleinsäure-  
fragmente angefügt werden.
- 10
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente auf  
einem Träger immobilisiert werden.
- 15
11. Verwendung nach Anspruch 10,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Träger eine Oberfläche aus Metall, Glas, Keramik, oder/und  
Kunststoff aufweist.
- 20
12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Träger aus Mikropartikel und Biochips ausgewählt wird.
- 25
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß durch die Spaltung eine Nukleinsäurebibliothek erzeugt wird.
- 30
14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente einer  
Nachweisreaktion unterzogen werden.

15. Verwendung nach Anspruch 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nachweisreaktion eine massenspektrometrische Analyse  
umfaßt.
- 5 16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nachweisreaktion eine Elektrophorese umfaßt.
- 10 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Nachweisreaktion eine Sequenzbestimmung umfaßt.
- 15 18. Verwendung nach Anspruch 17,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Sequenzbestimmung eine Zyklussequenzierung in Kombination mit einer Nukleinsäureamplifikation umfaßt.
- 20 19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Sequenzbestimmung bidirektional auf einem Nukleinsäurestrang erfolgt.
- 25 20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente für den Nachweis von Mutationen eingesetzt werden.
- 30 21. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie in Anspruch 1 definiert enthält.



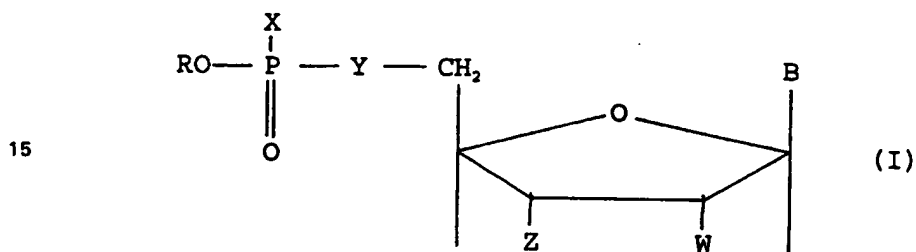
22. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als wirksame Komponente eine Nukleinsäure enthält, in die eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie in Anspruch 1 definiert eingebaut ist.
- 5 23. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines Mittels für die Gentherapie.
24. Verwendung der Zusammensetzung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines antiviralen Mittels oder Antitumormittels.
- 10 25. Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäurefragmenten umfassend die Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Nukleinsäure, die als monomeren Baustein mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält, und
- 15 (b) ortsspezifisches Spalten der Nukleinsäure.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet,
- 20 daß die durch Spaltung entstehenden Nukleinsäurefragmente am 5'-Ende die Gruppe  $\text{HY-CH}_2\text{-}$  aufweisen, wobei Y wie in Anspruch 1 definiert ist.
27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet,
- 25 daß die Nukleinsäurefragmente am 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweisen.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, weiterhin umfassend den Schritt:
- 30 (c) Unterziehen der Nukleinsäurefragmente einer Nachweisreaktion.

29. Nukleinsäure ,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie am 5'-Ende die Gruppe  $\text{HY-CH}_2$ - aufweist, wobei Y wie in  
Anspruch 1 definiert ist.

5

30. Verfahren nach Anspruch 29.  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie am 3'-Ende eine Phosphatgruppe aufweist.

- 10 31. Verbindung der allgemeinen Formel (I):



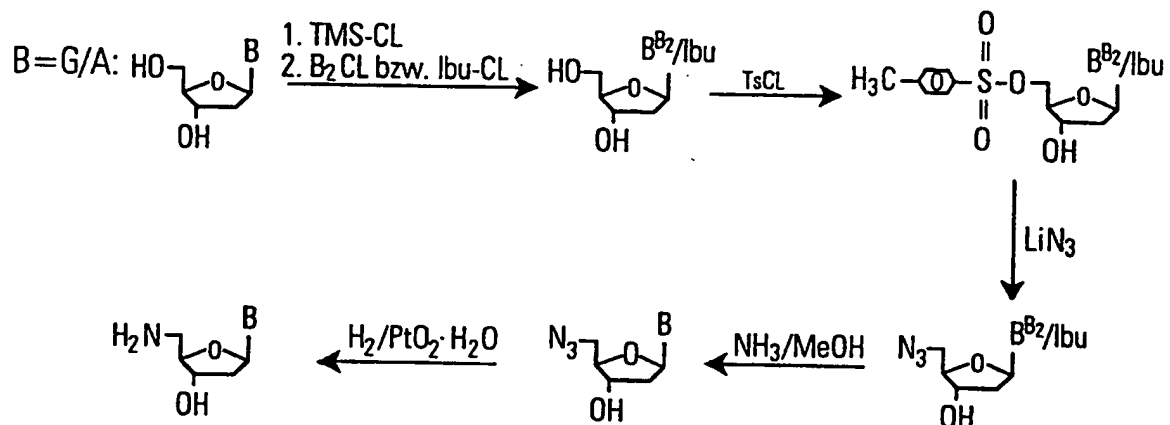
worin:

- 20 B eine Nukleobase bedeutet,  
W und Z jeweils  $\text{OR}^1$ ,  $\text{SR}^1$ ,  $\text{N}(\text{R}^1)_2$  oder  $\text{R}^1$  bedeuten,  
wobei  $\text{R}^1$  jeweils unabhängig bei jedem Vorkommen  
Wasserstoff oder einen organischen Rest darstellt,  
X  $\text{OR}^2$ ,  $\text{SR}^2$  oder  $\text{B}(\text{R}^2)_3$  bedeutet,  
25 wobei  $\text{R}^2$  jeweils unabhängig Wasserstoff, ein Kation oder  
einen organischen Rest bedeutet,  
Y  $\text{NR}^3$  oder S bedeutet, wobei  $\text{R}^3$  Wasserstoff oder einen  
organischen Rest darstellt und  
R Wasserstoff, ein Kation oder eine gegebenenfalls modifizierte  
30 Phosphat- oder Diphosphatgruppe bedeutet.

32. Reagenzienkit zum Nachweis von Nukleinsäuren,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß er mindestens eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) wie in  
Anspruch 1 definiert zusammen mit weiteren Nachweiskomponenten  
enthält.

FIG.1

A



B

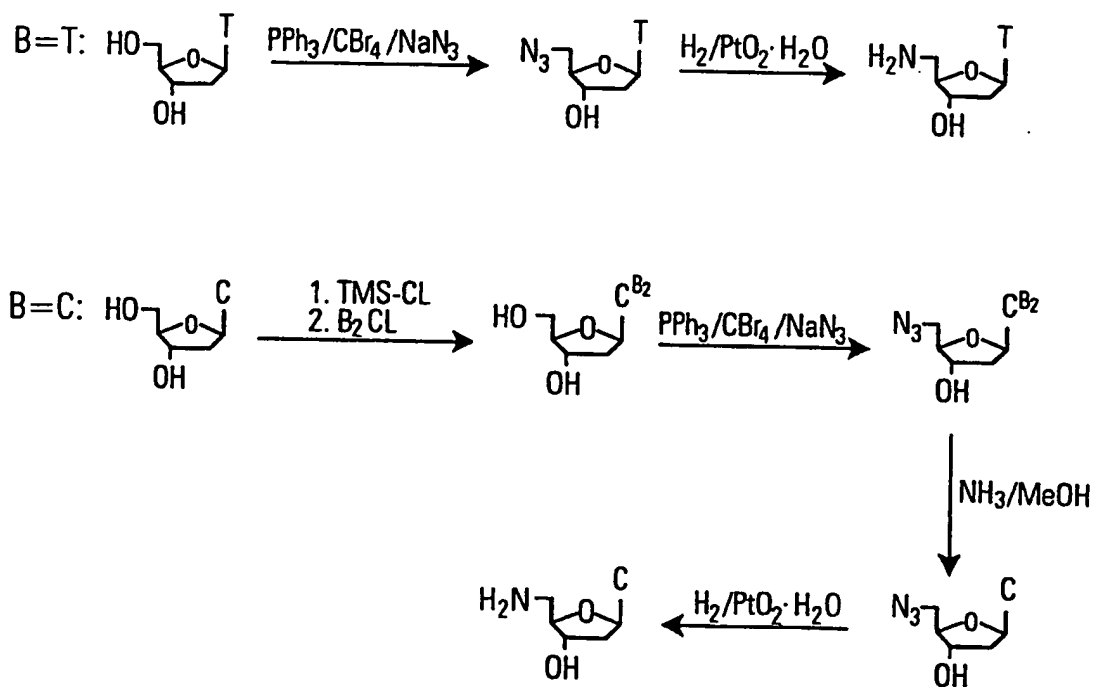
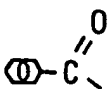
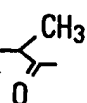
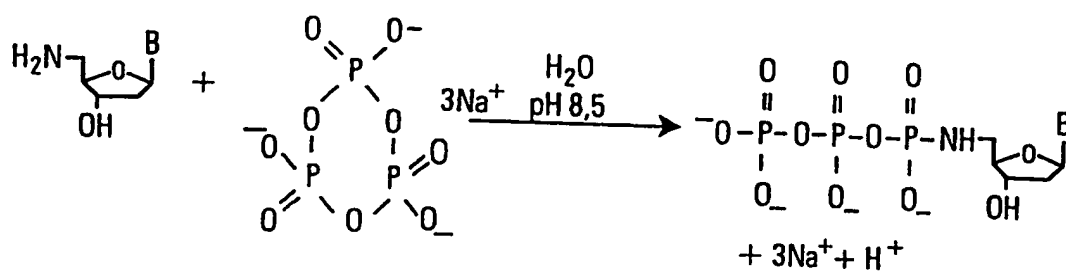
TMS = (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si -B<sub>2</sub> = Ibu = CH<sub>3</sub> - PPh<sub>3</sub> = (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>P

FIG.2



B = A, C, G, T

3/13

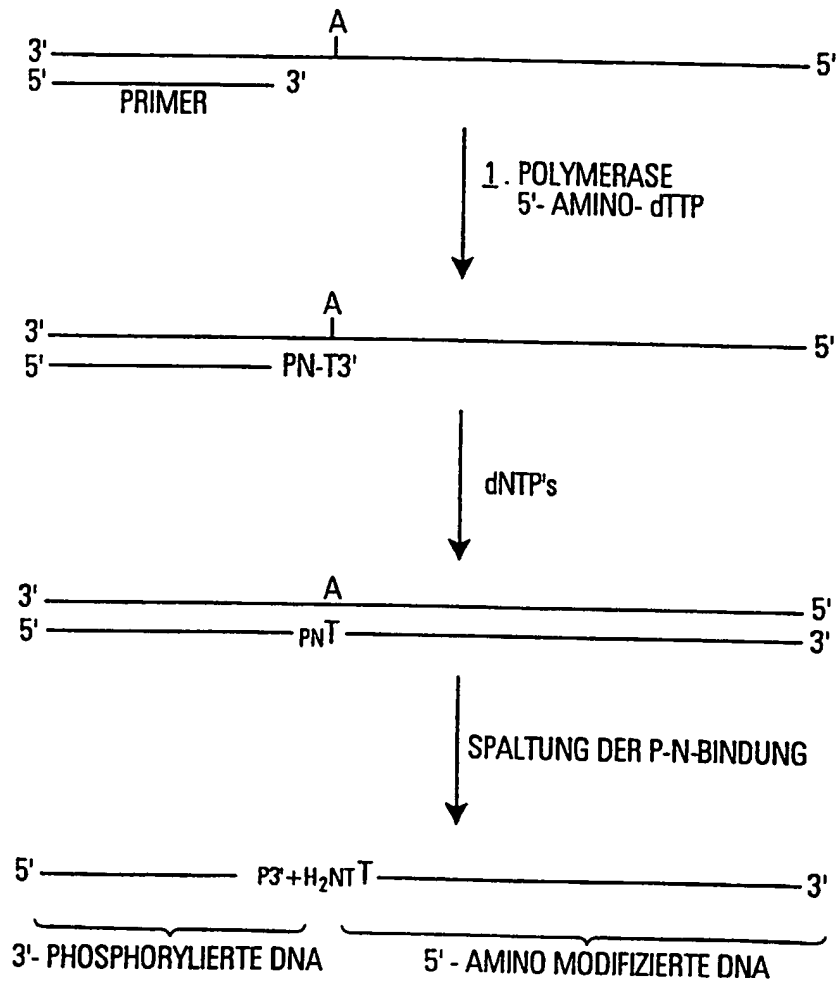
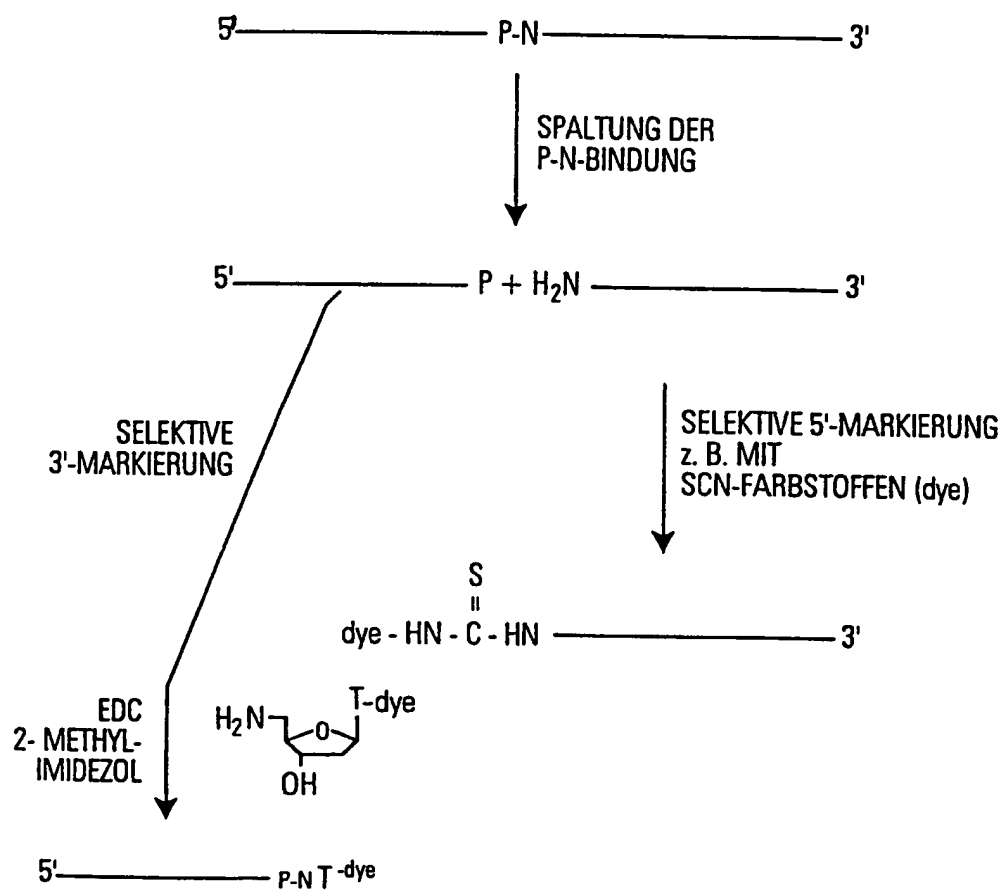
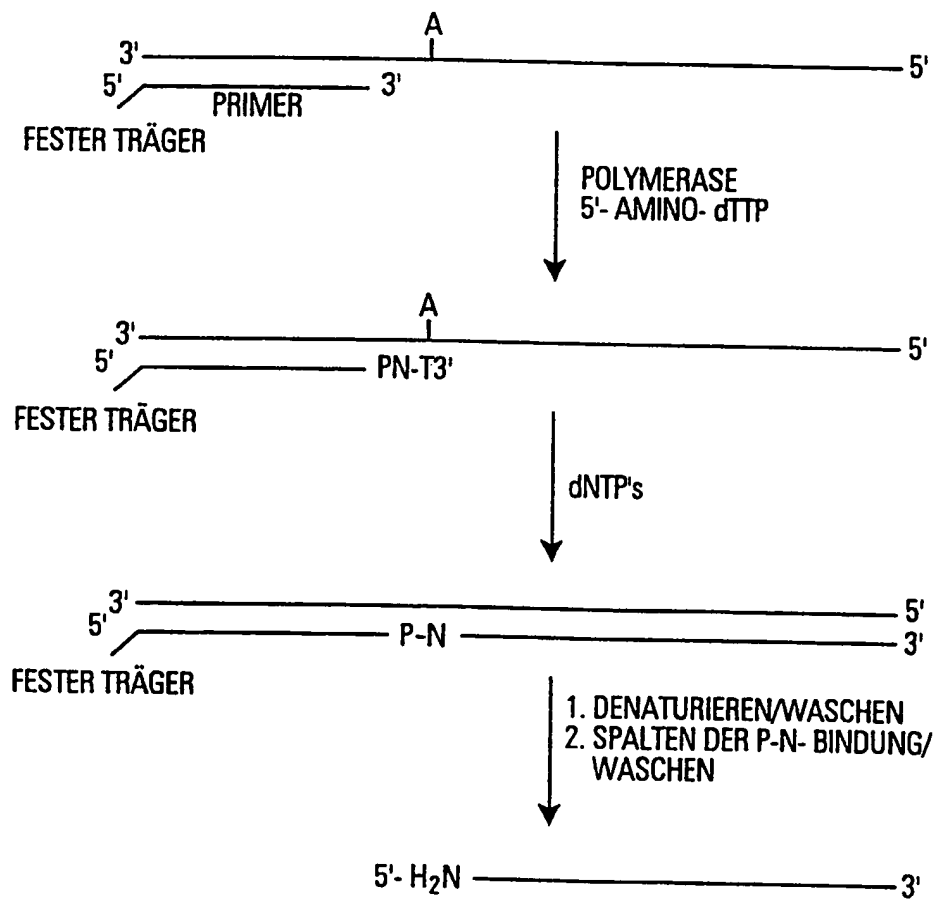
**FIG.3**

FIG.4

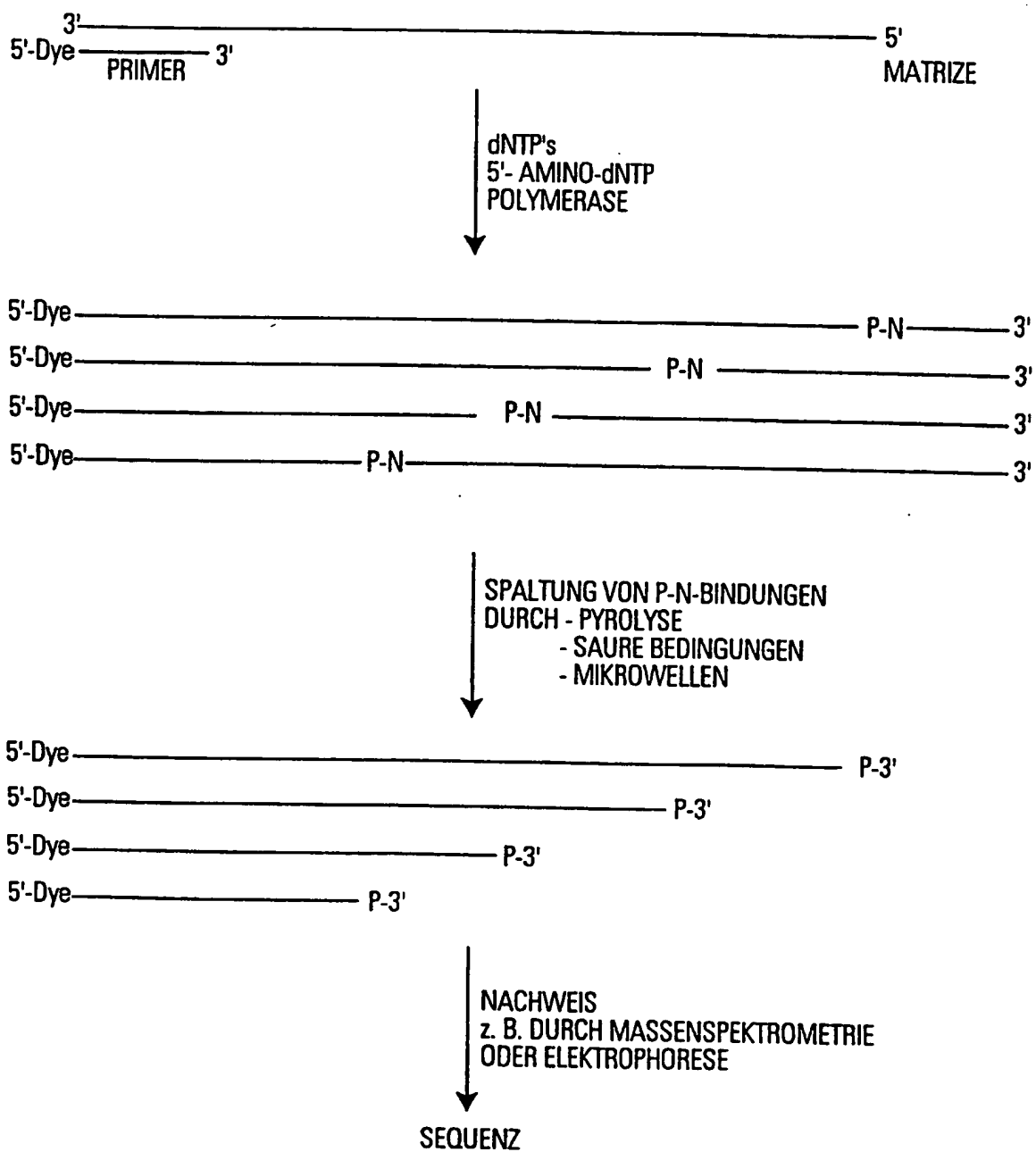


5/13

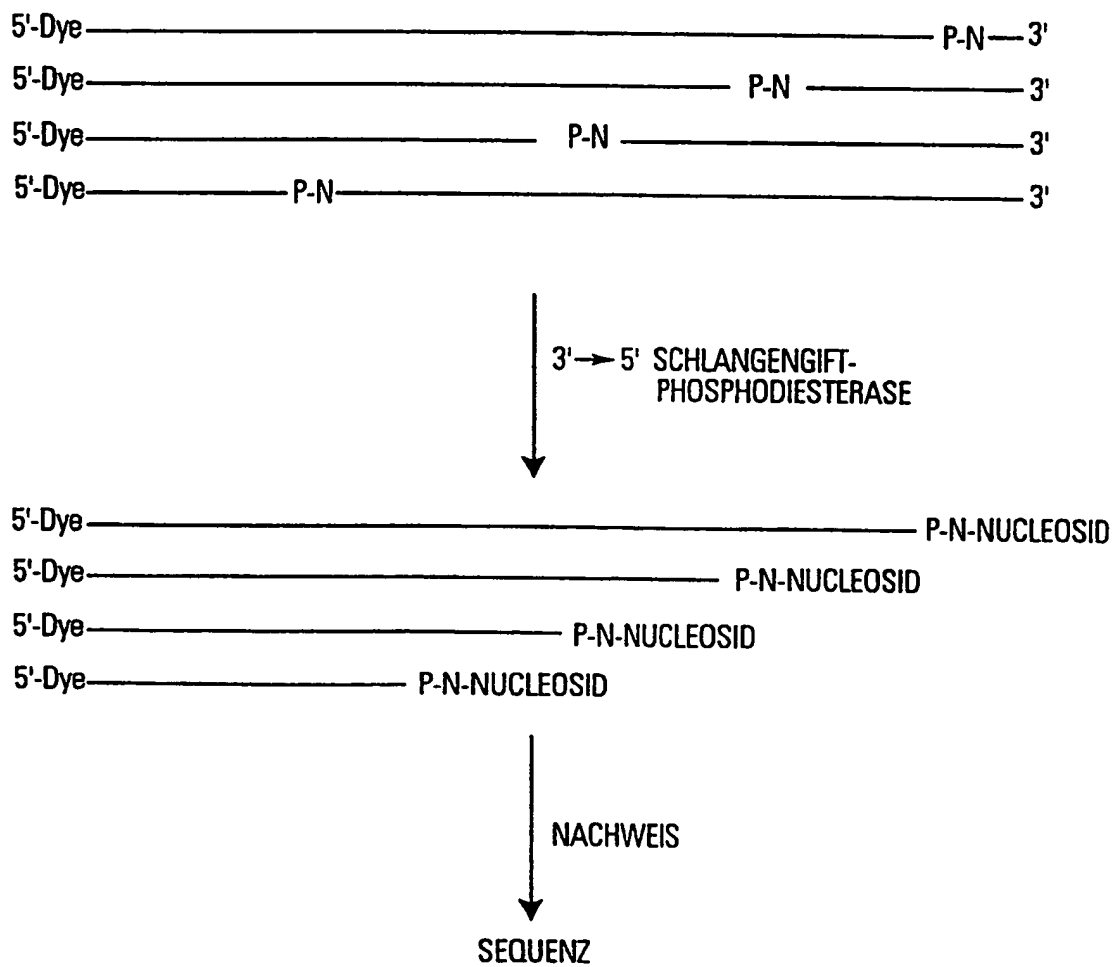
**FIG.5**

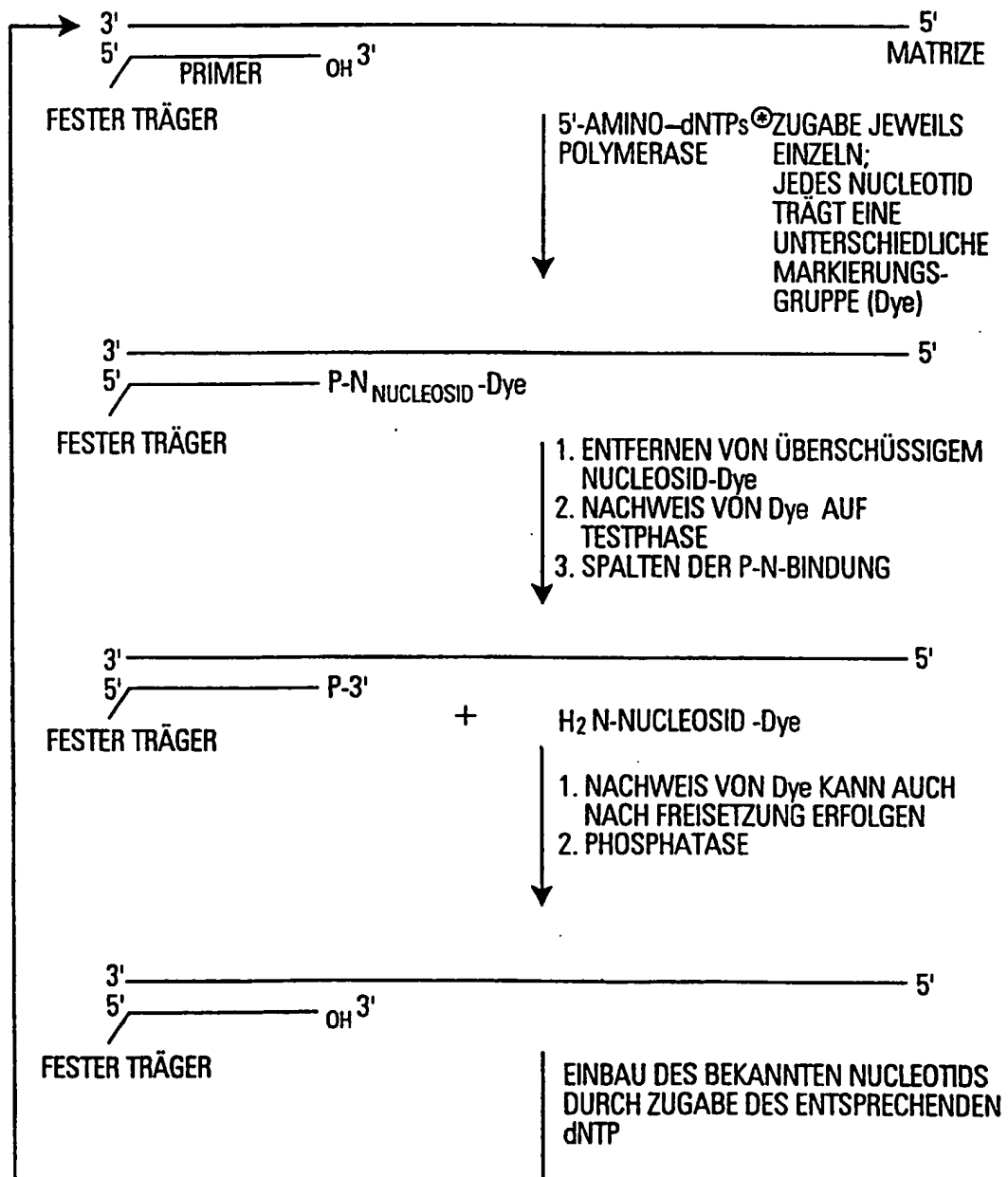


6/13

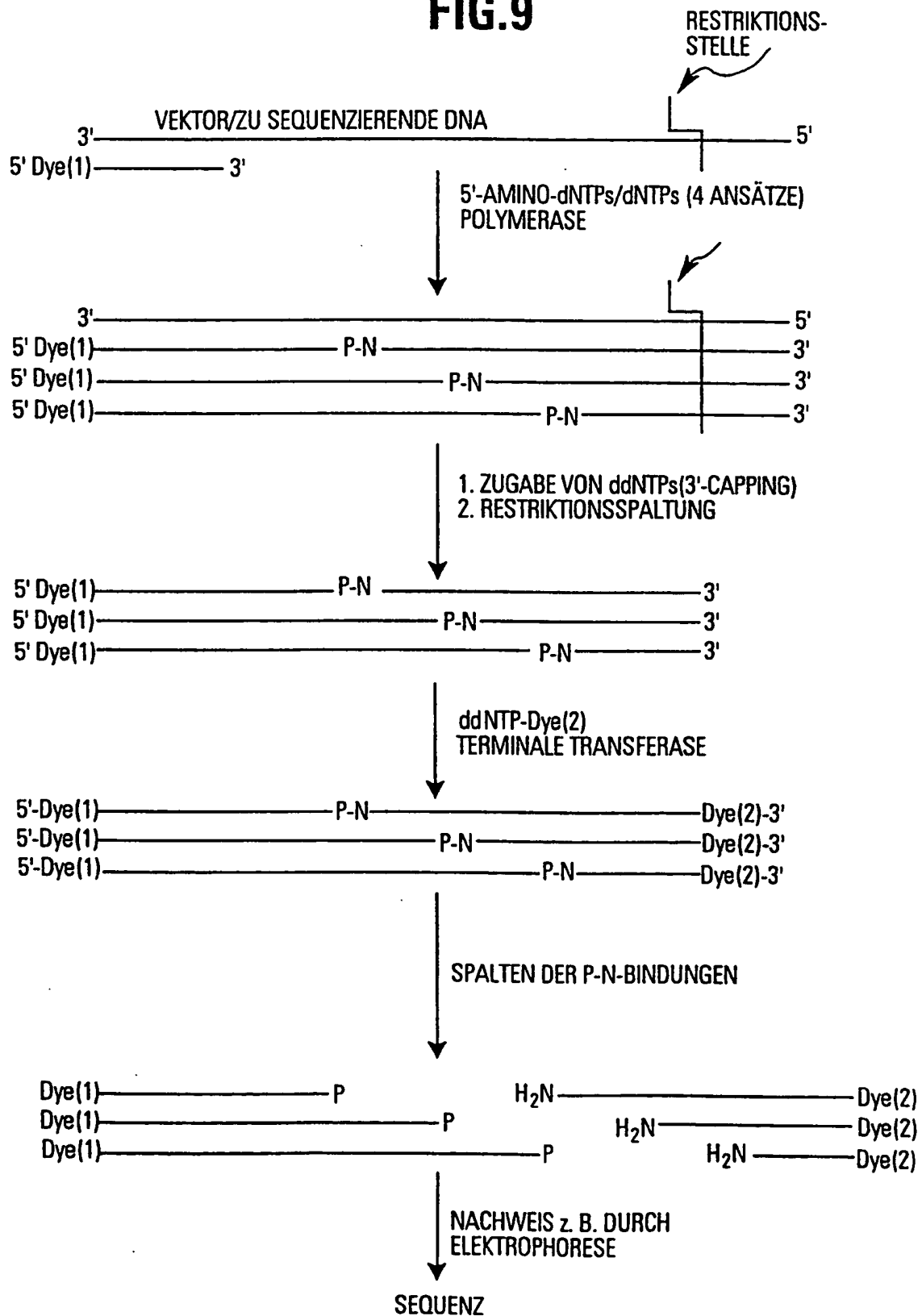
**FIG.6**

7/13

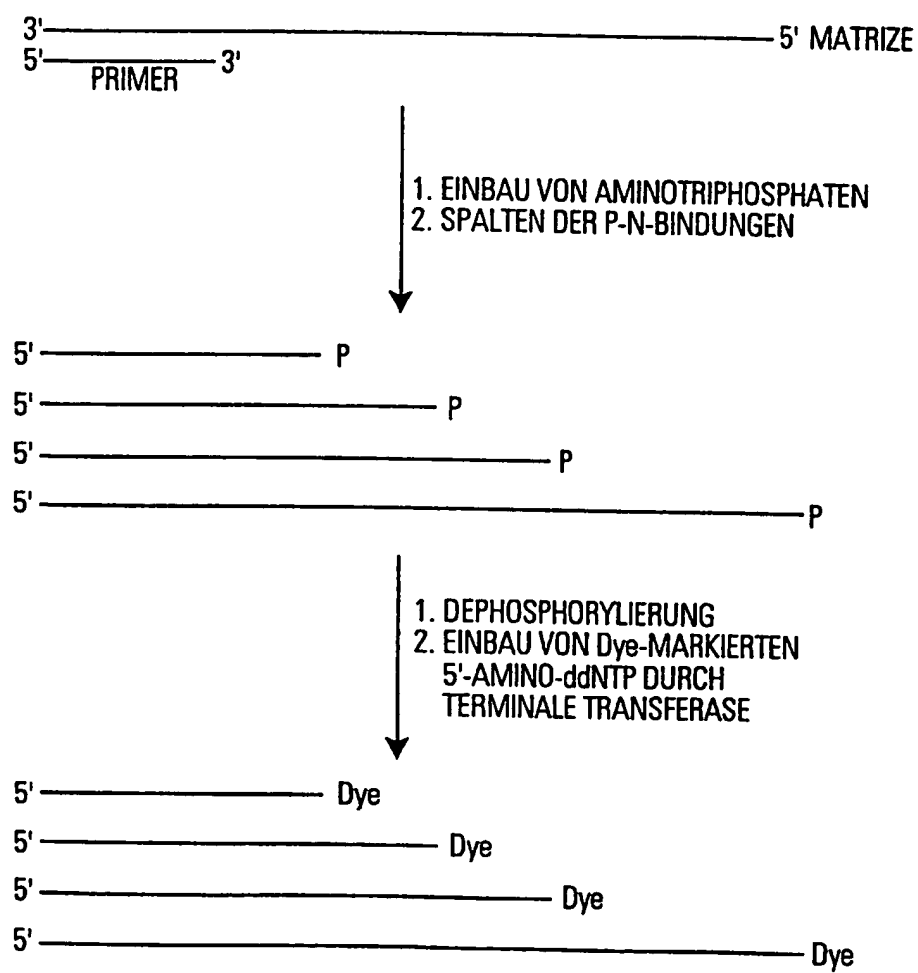
**FIG.7**

**FIG.8**

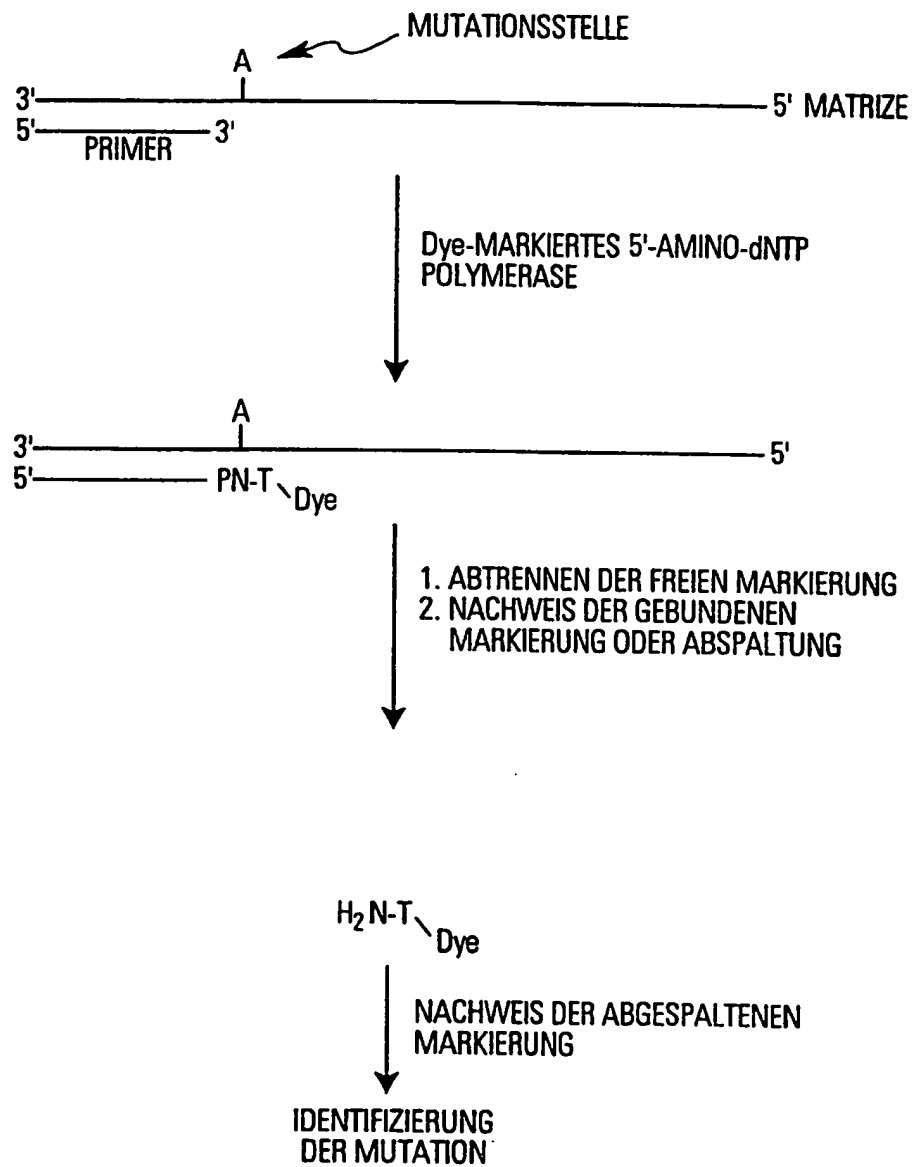
9/13

**FIG.9**

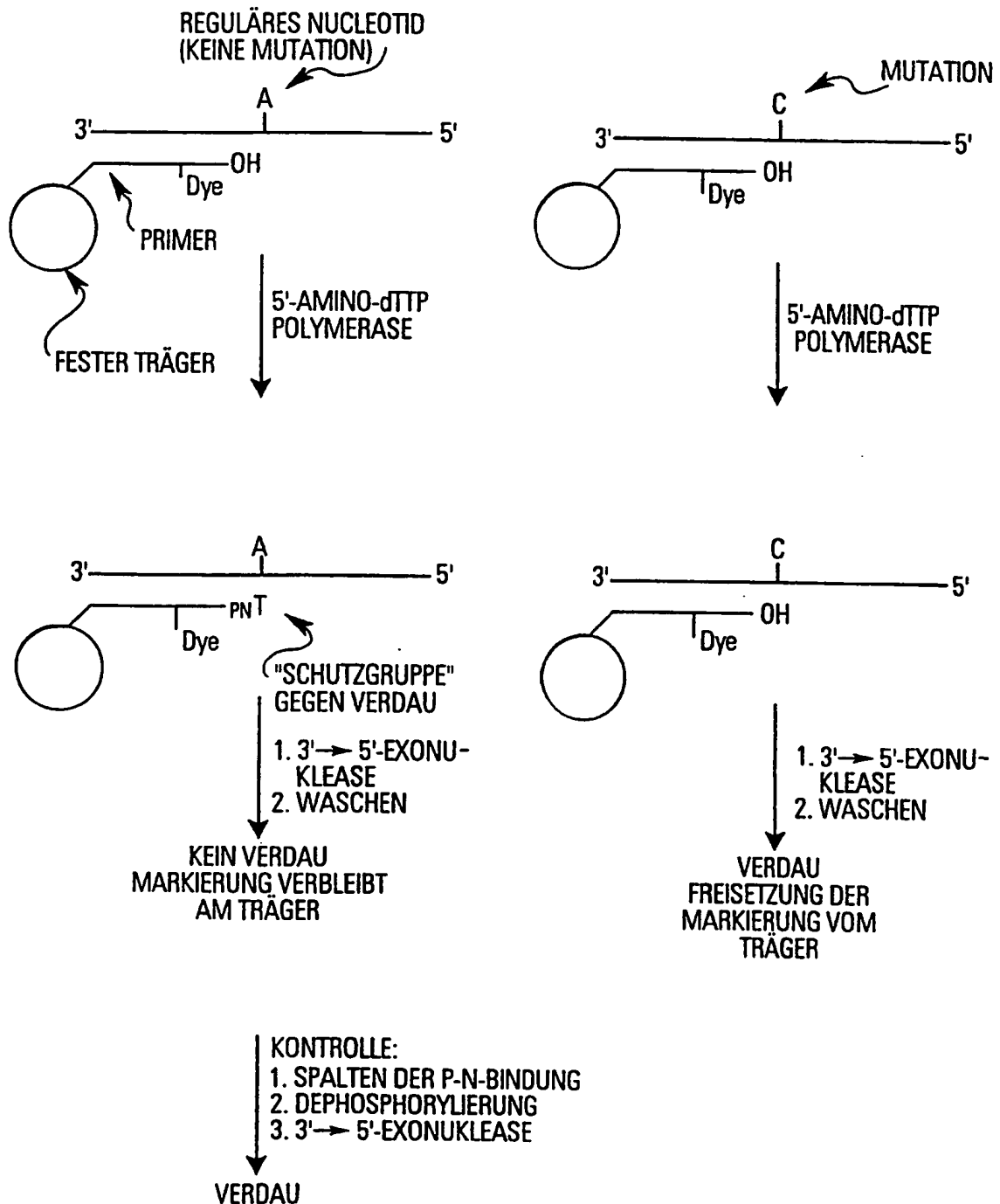
10/13

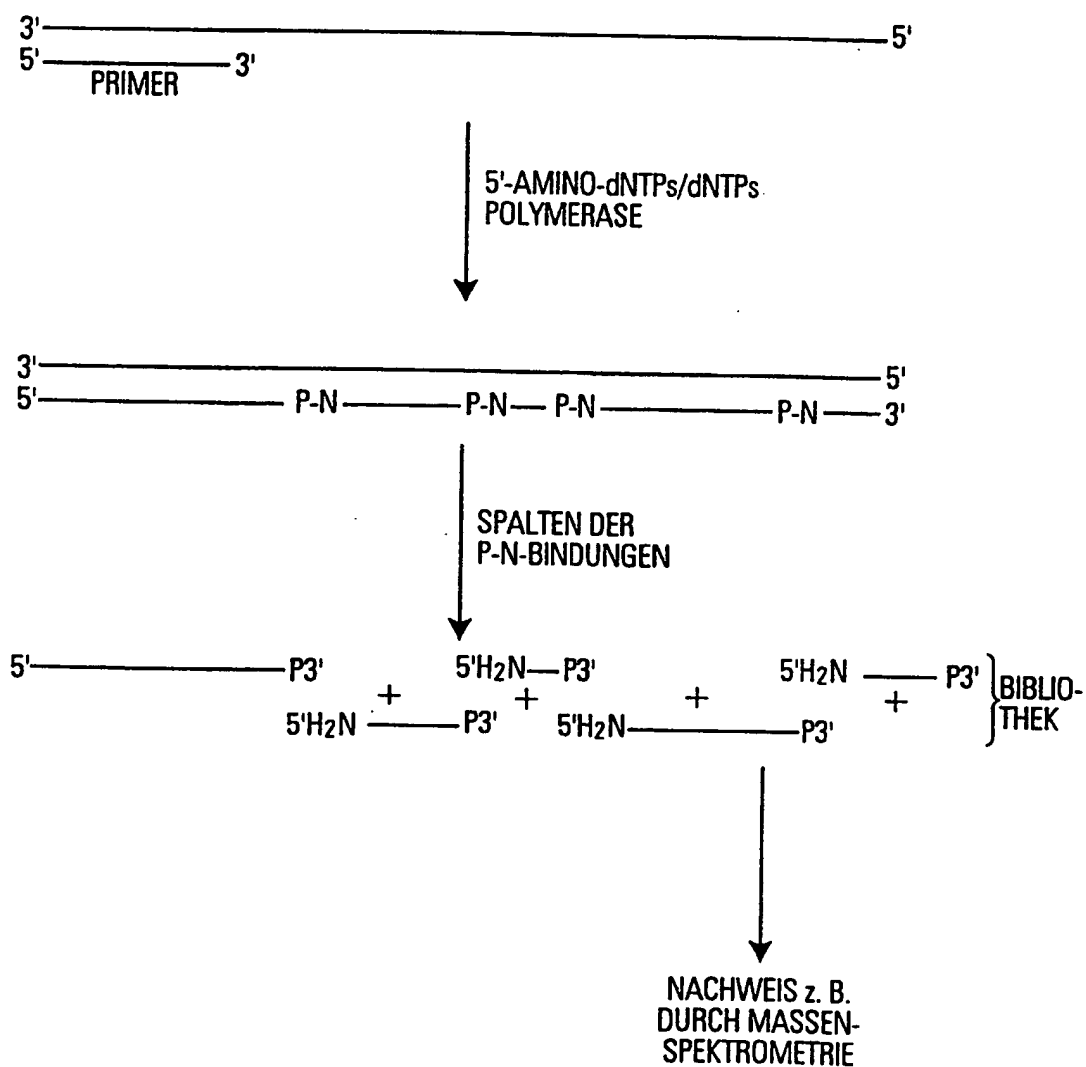
**FIG.10**

11/13

**FIG.11**

12/13

**FIG.12**

**FIG.13**



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12Q 1/68, C07H 21/00, 19/10, 19/20,</b> <b>A61K 31/70</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/53087</b>  <b>(43) Internationales</b> <b>Veröffentlichungsdatum:</b> 21. Oktober 1999 (21.10.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/02320 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 6. April 1999 (06.04.99)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 15 864.5      8. April 1998 (08.04.98)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> EU- ROPÄISCHES LABORATORIUM FÜR MOLEKULAR- BIOLOGIE (EMBL) [DE/DE]; Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> FAULSTICH, Konrad [DE/DE]; EMBL, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg (DE). ANSORGE, Wilhelm [DE/DE]; EMBL, Meyerhofs- trasse 1, D-69117 Heidelberg (DE).  <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-</b> <b>richts:</b> 2. Dezember 1999 (02.12.99)	
<b>(54) Title:</b> 5'-MODIFIED NUCLEOTIDES AND THE APPLICATION THEREOF IN MOLECULAR BIOLOGY AND MEDICINE  <b>(54) Bezeichnung:</b> 5'-MODIFIZIERTE NUKLEOTIDE UND IHRE ANWENDUNG IN DER MOLEKULARBIOLOGIE UND MEDIZIN  <b>(57) Abstract</b>  The invention relates to 5'-modified nucleotides and nucleic acids containing said nucleotides. The invention also relates to methods for integrating 5'-modified nucleotides in nucleic acids and subsequent localized splitting of the nucleic acids on the 5'-modified monomer structural elements. The inventive methods can be used in nucleic acid sequencing, in the creation of nucleic acid libraries, in the detection of mutations, in the production of carrier-bound nucleic acids and for pharmaceutical purposes.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die Erfindung betrifft 5'-modifizierte Nukleotide und diese Nukleotide enthaltende Nukleinsäuren. Weiterhin werden Verfahren zum Einbau der 5'-modifizierten Nukleotide in Nukleinsäuren und die anschließende ortspezifische Spaltung der Nukleinsäuren an den 5'-modifizierten Monomerbausteinen offenbart. Diese Verfahren können zur Nukleinsäuresequenzierung, zur Erzeugung von Nukleinsäurebibliotheken, zum Nachweis von Mutationen, zur Herstellung trägergebundener Nukleinsäuren und für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02320

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68 C07H21/00 C07H19/10 C07H19/20 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q C07H A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LETSINGER, ROBERT L.; WILKES, JOHN S.; DUMAS, LAWRENCE B.: "Nucleotide chemistry. XVII. Enzymic synthesis of polydeoxyribonucleotides possessing internucleotide phosphoramidate bonds" J. AMER. CHEM. SOC., vol. 94, no. 1, 1972, pages 292-3, XP002112658 the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-32



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 September 1999

Date of mailing of the international search report

15. 10. 99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardili, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02320

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN, MING S.; WARD, DAVID C.; PRUSOFF, WILLIAM H.: "5-Iodo-5'-amino-2',5'-dideoxyuridine-5'-N'-triphosphate. Synthesis, chemical properties, and effect on Escherichia coli thymidine kinase activity" J. BIOL. CHEM., vol. 251, no. 16, 1976, pages 4839-41, XP002112659 the whole document ---	21,23, 24,31
X	WO 96 19572 A (HYBRIDON INC ;TANG JINYAN (US); ROSKEY ALLYSEN M (US); AGRAWAL SUD) 27 June 1996 (1996-06-27) the whole document ---	22-24, 29-31
X	MAG, MATTHIAS; ENGELS, JOACHIM W.: "Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoramidate linkages" NUCLEIC ACIDS RES., vol. 17, no. 15, 1989, pages 5973-88, XP002112660 the whole document ---	1-32
X	MAG, MATTHIAS; LUEKING, SILKE; ENGELS, JOACHIM W.: "Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage" NUCLEIC ACIDS RES., vol. 19, no. 7, 1991, pages 1437-41, XP002112661 the whole document ---	1-32
X	DE 34 46 635 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 27 June 1985 (1985-06-27) the whole document ---	29,30
X	TROWBRIDGE, DALE B.; YAMAMOTO, DIANE M.; KENYON, GEORGE L.: "Ring openings of trimetaphosphoric acid and its bismethylene analog.Syntheses of adenosine 5'-bis(dihydroxyphosphinylmethyl) phosphinate and 5'-amino-5'-deoxyadenosine 5'-triphosphate" J. AMER. CHEM. SOC., vol. 94, no. 11, 1972, pages 3816-24, XP002112662 the whole document ---	31
	---	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02320

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PATEL, BHISMA KUMAR; ECKSTEIN, FRITZ:  "5'-Deoxy-5'-thioribonucleoside-5'-triphosphates"  TETRAHEDRON LETT.,  vol. 38, no. 6, 1997, pages 1021-4,  XP002112663  the whole document</p> <p>---</p>	31
X	<p>STUETZ, ANTON; SCHEIT, KARL H.:  "Properties of ATP and UTP analogs with  phosphorus-sulfur-carbon-5'-bonds"  EUR. J. BIOCHEM.,  vol. 50, no. 2, 1975, pages 343-9,  XP002112664  the whole document</p> <p>---</p>	31
A	<p>WO 95 06752 A (UNIV DUKE)  9 March 1995 (1995-03-09)  -----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02320

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 31  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See supplemental sheet Additional matter PCT/ISA 210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Field I.2. cont'd

Claim No. 31

In its initial phase, the search revealed a very large number of documents that were prejudicial as to novelty with respect to Claim 31. For this reason a meaningful search with respect to the entire scope of the patent claim seems impossible. The search was therefore limited to:

Triphosphates as represented in Figure 2 in the application.

The applicant is reminded that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1 (e)). In its capacity as the authority dealing with the international preliminary examination, the EPO as a general rule does not conduct a preliminary examination of subject matter for which no search has been provided. This also applies to the case where the patent claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or to the case where the applicant provides new patent claims pursuant to the procedure mentioned in Chapter II of the PCT.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02320

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9619572	A	27-06-1996	AU 4514696 A	10-07-1996
			CA 2208528 A	27-06-1996
			CN 1175281 A	04-03-1998
			EP 0807171 A	19-11-1997
			JP 10511267 T	04-11-1998
-----				
DE 3446635	A	27-06-1985	CA 1244786 A	15-11-1988
			FR 2556726 A	21-06-1985
			GB 2153356 A,B	21-08-1985
			JP 1951595 C	28-07-1995
			JP 6078353 B	05-10-1994
			JP 6145192 A	24-05-1994
			JP 1250393 A	05-10-1989
			JP 1769567 C	30-06-1993
			JP 4060600 B	28-09-1992
			JP 1057119 B	04-12-1989
			JP 1573676 C	20-08-1990
			JP 60197698 A	07-10-1985
			SE 466208 B	13-01-1992
			SE 8406484 A	21-06-1985
			US 5015733 A	14-05-1991
			US 5118802 A	02-06-1992
			US 5118800 A	02-06-1992
			US 4849513 A	18-07-1989
-----				
WO 9506752	A	09-03-1995	AU 7679394 A	22-03-1995
			US 5683869 A	04-11-1997
			US 5859231 A	12-01-1999
-----				



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/02320</b>	
<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 C12Q1/68 C07H21/00 C07H19/10 C07H19/20 A61K31/70	
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK	
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12Q C07H A61K	
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen	
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)	
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>	
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile
X	LETSINGER, ROBERT L.; WILKES, JOHN S.; DUMAS, LAWRENCE B.: "Nucleotide chemistry. XVII. Enzymic synthesis of polydeoxyribonucleotides possessing internucleotide phosphoramidate bonds" J. AMER. CHEM. SOC., Bd. 94, Nr. 1, 1972, Seiten 292-3, XP002112658 das ganze Dokument <div style="text-align: center;">--- -/--</div>
	Betr. Anspruch Nr.
	1-32
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</span> </div>	
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>	
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <div style="text-align: center;">13. September 1999</div>	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: center;"><b>15. 10. 99</b></div>
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  <div style="text-align: center;">Bardili, W</div>

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02320

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEN, MING S.; WARD, DAVID C.; PRUSOFF, WILLIAM H.: "5-Iodo-5'-amino-2',5'-dideoxyuridine-5'-N'-triphosphate. Synthesis, chemical properties, and effect on Escherichia coli thymidine kinase activity" J. BIOL. CHEM., Bd. 251, Nr. 16, 1976, Seiten 4839-41, XP002112659 das ganze Dokument	21,23, 24,31
X	WO 96 19572 A (HYBRIDON INC ;TANG JINYAN (US); ROSKEY ALLYSEN M (US); AGRAWAL SUD) 27. Juni 1996 (1996-06-27) das ganze Dokument	22-24, 29-31
X	MAG, MATTHIAS; ENGELS, JOACHIM W.: "Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoramidate linkages" NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 17, Nr. 15, 1989, Seiten 5973-88, XP002112660 das ganze Dokument	1-32
X	MAG, MATTHIAS; LUEKING, SILKE; ENGELS, JOACHIM W.: "Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage" NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 19, Nr. 7, 1991, Seiten 1437-41, XP002112661 das ganze Dokument	1-32
X	DE 34 46 635 A (CALIFORNIA INST OF TECHN) 27. Juni 1985 (1985-06-27) das ganze Dokument	29,30
X	TROWBRIDGE, DALE B.; YAMAMOTO, DIANE M.; KENYON, GEORGE L.: "Ring openings of trimetaphosphoric acid and its bismethylene analog.Syntheses of adenosine 5'-bis(dihydroxyphosphinylmethyl) phosphinate and 5'-amino-5'-deoxyadenosine 5'-triphosphate" J. AMER. CHEM. SOC., Bd. 94, Nr. 11, 1972, Seiten 3816-24, XP002112662 das ganze Dokument	31

-/--

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02320

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PATEL, BHISMA KUMAR; ECKSTEIN, FRITZ:  "5'-Deoxy-5'-thioribonucleoside-5'-triphosphates"  TETRAHEDRON LETT.,  Bd. 38, Nr. 6, 1997, Seiten 1021-4,  XP002112663  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	31
X	<p>STUETZ, ANTON; SCHEIT, KARL H.:  "Properties of ATP and UTP analogs with  phosphorus-sulfur-carbon-5'-bonds"  EUR. J. BIOCHEM.,  Bd. 50, Nr. 2, 1975, Seiten 343-9,  XP002112664  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	31
A	<p>WO 95 06752 A (UNIV DUKE)  9. März 1995 (1995-03-09)</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/02320

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 31   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich   
 siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 31

Die Recherche ergab in ihrer Anfangsphase eine sehr große Zahl neuheitsschädlicher Dokumente zu Anspruch 31. Aus diesen Gründen erscheint eine sinnvolle Recherche über den gesamten Bereich des Patentanspruches unmöglich. Die Recherche wurde daher beschränkt auf:

Triphosphate wie sie in Figur 2 in der Anmeldung dargestellt sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**  
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02320

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied( r) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9619572 A	27-06-1996	AU 4514696 A	10-07-1996
		CA 2208528 A	27-06-1996
		CN 1175281 A	04-03-1998
		EP 0807171 A	19-11-1997
		JP 10511267 T	04-11-1998
-----			
DE 3446635 A	27-06-1985	CA 1244786 A	15-11-1988
		FR 2556726 A	21-06-1985
		GB 2153356 A,B	21-08-1985
		JP 1951595 C	28-07-1995
		JP 6078353 B	05-10-1994
		JP 6145192 A	24-05-1994
		JP 1250393 A	05-10-1989
		JP 1769567 C	30-06-1993
		JP 4060600 B	28-09-1992
		JP 1057119 B	04-12-1989
		JP 1573676 C	20-08-1990
		JP 60197698 A	07-10-1985
		SE 466208 B	13-01-1992
		SE 8406484 A	21-06-1985
		US 5015733 A	14-05-1991
		US 5118802 A	02-06-1992
		US 5118800 A	02-06-1992
		US 4849513 A	18-07-1989
-----			
WO 9506752 A	09-03-1995	AU 7679394 A	22-03-1995
		US 5683869 A	04-11-1997
		US 5859231 A	12-01-1999
-----			